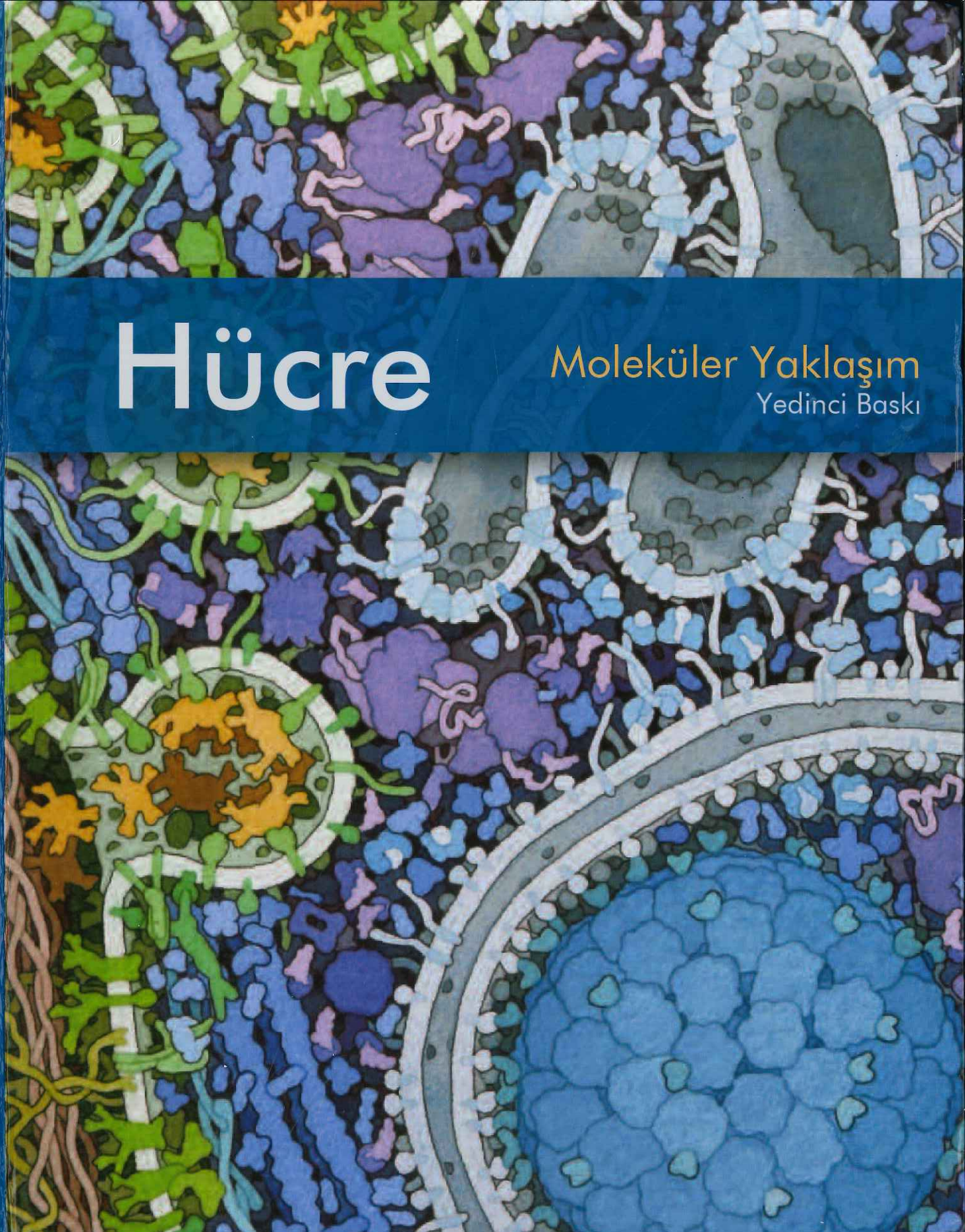


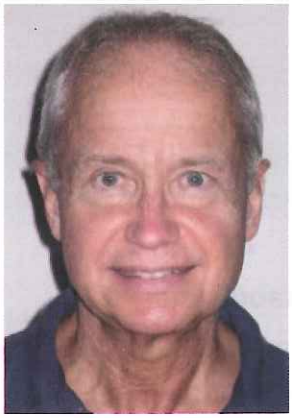
Hücre

Moleküler Yaklaşım

Yedinci Baskı

Geoffrey M. Cooper • Robert E. Hausman

Çeviri Editörleri: Neşe ATABEY • Ersan KALAY • Meral SAKIZLI



Değerli arkadaşım, meslektaşım ve eş yazar
Robert E. Hausman (1947-2015)
anısına

Geoffrey M. Cooper

Kısa İçerik

KISIM I
Temeller ve Esaslar 1

Bölüm 1 Hücrelere ve Hücre Araştırmalarına Genel Bir Bakış 3
Bölüm 2 Moleküller ve Zarlar 47
Bölüm 3 Biyoenerjetik ve Metabolizma 81
Bölüm 4 Moleküler Biyolojinin Temelleri 111
Bölüm 5 Genomik, Proteomik ve Sistem Biyolojisi 157

KISIM II
Genetik Bilgi Akışı 185

Bölüm 6 Genler ve Genomlar 187
Bölüm 7 Genomik DNA'nın Replikasyonu, Korunması ve Yeniden Düzenlenmesi 217
Bölüm 8 RNA Sentezi ve İşlenmesi 259
Bölüm 9 Protein Sentezi, İşlenmesi ve Düzenlenmesi 317

KISIM III
Hücre Yapısı ve İşlevi 365

Bölüm 10 Nükleus 367
Bölüm 11 Protein Tasnifi ve Taşınması
Bölüm 12 Mitokondri, Kloroplastlar ve Peroksizomlar 447
Bölüm 13 Hücre İskeleti ve Hücre Hareketi 479
Bölüm 14 Plazma Zarı 531
Bölüm 15 Hücre Duvarları, Hücre Dışı Matriks ve Hücre Etkileşimleri 571

KISIM IV
Hücre Regülasyonu 599

Bölüm 16 Hücre Sinyal İletimi 601
Bölüm 17 Hücre Döngüsü 651
Bölüm 18 Hücre Ölümü ve Hücre Yenilenmesi 691
Bölüm 19 Kanser 723

İçerik

KISIM I
Temeller ve Esaslar 1

Bölüm 1 Hücrelere ve Hücre Araştırmalarına Genel Bir Bakış 3

Hücrelerin Kökeni ve Evrimi 4
İlk hücre 4
Metabolizmanın evrimi 7
Günümüz prokaryotları 8
Ökaryot hücreler 9
Ökaryotların kökeni 11
Çok hücreli organizmaların gelişimi 13

Deneysel Model Olarak Hücreler 17
E. coli 17
Mayalar 18
Caenorhabditis elegans 19
Drosophila melanogaster 20
Arabidopsis thaliana 20
Omurgalılar 20

Hücre Biyolojisinin Araçları 23
Işık mikroskopisi 23
Elektron mikroskopisi 30
Süper çözünürlüklü ışık mikroskopisi 32
Hücreyi alt bileşenlerine ayırma 34
Hayvan hücrelerinin kültürde üretilmesi 37
Anahtar Deney
HeLa Hücreleri 39
Bitki hücresi kültürleri 39
Virüsler 40
Moleküler Tıp
Virüsler ve Kanser 41

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 43
SORULAR 44
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 45

Bölüm 2 Moleküller ve Zarlar 47

Hücre Molekülleri 47
Karbohidratlar 48
Lipidler 50
Nükleik asitler 54
Proteinler 56
Anahtar Deney
Polipeptid Zincirlerinin Katlanması 58

Biyolojik Katalizörler Olarak Enzimler 62
Enzimlerin katalitik aktiviteleri 62
Enzimatik kataliz mekanizmaları 63
Koenzimler 66
Enzim aktivitesinin düzenlenmesi 68

Hücre Zarları 70
Zar lipidleri 70
Zar proteinleri 71
Anahtar Deney
Hücre Zarlarının Yapısı 73

Hücre zarlarından taşıma 74
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 77
SORULAR 78
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 78

Bölüm 3 Biyoenerjetik ve Metabolizma 81

Metabolik Enerji ve ATP 81
Serbest enerji ve ATP 81
Glikoliz ve Krebs döngüsü 84
Lipidlerden enerji elde edilmesi 89
Elektron Taşınımı ve Oksidatif Fosforilasyon 89
Elektron taşıma zinciri 90
Kemiozmotik kenetlenme 92
Anahtar Deney
Kemiozmotik Teori 93
Fotosentez 95
Elektron taşınması 96
ATP sentezi 99
Glukoz sentezi 99
Hücre Bileşenlerinin Biyosentezi 101
Karbonhidratlar 101
Lipidler 102
Proteinler 103
Anahtar Deney
Antimetabolitler ve Kemoterapi 105
Nükleik asitler 106
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 107
SORULAR 108
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 109

Bölüm 4 Moleküler Biyolojinin Temelleri 111

Kalıtım, Genler ve DNA 111
Genler ve kromozomlar 111
Genler ve enzimler 115
DNA'nın genetik materyal olduğunun belirlenmesi 115
DNA'nın yapısı 116
DNA'nın replikasyonu 118
Genetik Bilginin Ekspresyonu 119
Genler ile proteinler arasında doğrusal ilişki 119
Mesajcı RNA'nın rolü 120
Genetik kod 121
RNA virüsleri ve revers transkripsiyon 124
Anahtar Deney
DNA Provirüs Hipotezi 125
Rekombinant DNA 126
Restriksiyon endonükleazlar 126
Rekombinant DNA moleküllerinin oluşturulması 128
Rekombinant DNA vektörleri 130
DNA dizi analizi 132
Klonlanmış genlerin ekspresyonu 134
Nükleik Asitler ve Proteinlerin Saptanması 135
DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu 135
Nükleik asit hibridizasyonu 137
Protein probları olarak antikorlar 140
Ökaryotlarda Gen Fonksiyonu 142
Bitkilerde ve hayvanlarda gen aktarımı 142
Klonlanmış DNA'larda mutasyon oluşturma 144
Hücresel genlerde mutasyon oluşturma 146
CRISPR/Cas sistemi ile genom mühendisliği 148
Hücresel genlerin gen ekspresyonunun engellenmesi 148
Anahtar Deney
RNA interferens 151
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 153
SORULAR 154
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 155

Bölüm 5 Genomik, Proteomik ve Sistem Biyolojisi 157

Genomlar ve Transkriptomlar 157

Bakteri ve maya genomları 157
Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster, ve Arabidopsis thaliana genomları 159
İnsan genomu 160
Diğer omurgalıların genomları 163

Anahtar Deney

İnsan Genomu 161

Yeni nesil dizileme ve kişisel genomlar 164
Gen ekspresyonunun geniş çaplı analizleri 166

Proteomik 167

Hücre proteinlerinin tanımlanması 167
Protein lokalizasyonunun geniş çaplı analizi 170
Protein etkileşimleri 171

Sistem Biyolojisi 173

Gen fonksiyonunun sistematik taraması 174
Gen ekspresyonunun düzenlenmesi 175
Ağlar 176
Sentetik biyoloji 178

Moleküler Tıp

Sıtma ve Sentetik Biyoloji 180

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 181
SORULAR 182
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 183

KISIM II Genetik Bilgi Akışı 185

Bölüm 6 Genler ve Genomlar 187

Ökaryotik Genlerin Yapısı 187

İntronlar ve eksonlar 188

Anahtar Deney

İntronların Keşfi 190

İntronların rolleri 192

Kodlamayan Diziler 194

Kodlamayan RNA'lar 194

Anahtar Deney

ENCODE Projesi 195

Tekrarlayan diziler 197
Gen duplikasyonu ve psödogenler 201

Kromozomlar ve Kromatin 203

Kromatin 204
Sentromerler 208
Telomerler 213

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 214
SORULAR 215
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 215

Bölüm 7 Genomik DNA'nın Replikasyonu, Korunması ve Yeniden Düzenlenmesi 217

DNA Replikasyonu 217

DNA polimerazlar 217
Replikasyon çatalı 218
Replikasyonun doğruluğu 225
Başlangıç noktaları (orjinler) ve replikasyonun başlaması 226
Telomerler ve telomeraz: Kromozom uçlarının replikasyonu 230

DNA Tamiri 232

DNA hasarının doğrudan geri döndürülmesi 233
Kesip çıkarma (eksizyon) tamiri 235

Translezyon DNA sentezi 240
Moleküler Tıp
Kolon Kanseri ve DNA Onarımı 241
Çift iplik kırıklarının tamiri 241
DNA Yeniden Düzenlenmeleri 243
Maya eşleşme tipleri 244
Antikor genleri 245
Anahtar Deney
İmmünglobulin Genlerinin Yeniden Düzenlenmesi 246
Gen amplifikasyonu 252
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 254
SORULAR 255
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 256

Bölüm 8 RNA Sentezi ve İşlenmesi 259

Bakterilerde Transkripsiyon 259
RNA polimeraz ve transkripsiyon 260
Represörler ve transkripsiyonun negatif kontrolü 263
Transkripsiyonunun pozitif kontrolü 264
Ökaryotik RNA Polimerazlar ve Genel Transkripsiyon Faktörleri 265
Ökaryotik RNA polimerazlar 265
Genel transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz II ile transkripsiyonun başlatılması 266
RNA polimeraz I ve III ile transkripsiyon 269
Ökaryotlarda Transkripsiyonun Düzenlenmesi 271
cis-etkili regülatör diziler: promotörler ve güçlendiriciler 271
Transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri 274
Transkripsiyon düzenleyici proteinler 276
Anahtar Deney
Bir Ökaryotik Transkripsiyon Faktörünün İzolasyonu 279
Transkripsiyon aktivatörlerinin yapısı ve fonksiyonu 280
Ökaryotik represörler (baskılayıcılar) 282
Uzamanın düzenlenmesi 283
Kromatin ve Epigenetik 284
Histon modifikasyonları 284
Kromatin yeniden yapılandırma faktörleri 289
Histonlar ve epigenetik kalıtım 290
DNA metilasyonu 292
Kodlamayan RNA' lar 293
RNA İşlenmesi ve Dönüşümü 295
Ribozomal ve taşıyıcı RNA' ların işlenmesi 296
Ökaryotlarda mRNA' nın işlenmesi 297
Kesip-ekleme (splicing) mekanizmaları 300
Anahtar Deney
snRNP'lerin Keşfi 303
Alternatif kesip-ekleme işlemi 306
RNA düzeltme (editing) 308
RNA yıkımı 309
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 310
SORULAR 313
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 313

Bölüm 9 Protein Sentezi, İşlenmesi ve Düzenlenmesi 317

mRNA'nın Translasyonu 317
Taşıyıcı RNA' lar 317
Ribozom 319
Mesajcı RNA'nın organizasyonu ve translasyonun başlaması 324
Translasyon süreci 326
Translasyonun düzenlenmesi 332
Protein Katlanması ve İşlenmesi 338
Şaperonlar ve protein katlanması 338
Protein katlanma hastalıkları 341
Moleküler Tıp
Alzheimer Hastalığı 342
Protein katlanmasını katalize eden enzimler 343
Protein kesimi 344
Glikozillenme 346
Lipidlerin Takılması 347
Protein Fonksiyonunun Düzenlenmesi 350
Küçük moleküllerle düzenlenme 350

Protein fosforillenmesi ve diğer modifikasyonlar 351

Anahtar Deney

Protein-Tirozin Kinazın Keşfi 353

Protein - protein etkileşimleri 356

Protein Yıkımı 357

Übikütin - proteazom yolağı 357

Lizozomal proteoliz 358

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 360

SORULAR 361

KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 362

KISIM III Hücre Yapısı ve İşlevi 365

Bölüm 10 Nükleus 367

Nükleer Zarf ve Nükleus ile Sitoplazma Arasındaki Trafik 367

Nükleer zarfın yapısı 367

Moleküler Tıp

Nükleer Lamina Hastalıkları 371

Nükleer por kompleksi 372

Proteinlerin nükleusa ve nükleusdan seçici taşınımı 373

Anahtar Deney

Nükleer Lokalizasyon Sinyallerinin Tanımlanması 374

RNA'ların taşınması 378

Nükleer proteinlerin içeri girişlerinin (import) düzenlenmesi 380

Kromozomların Organizasyonu 381

Kromozom bölgeleri 381

Kromatin lokalizasyonu ve transkripsiyonel aktivite 382

Replikasyon ve transkripsiyon fabrikaları 385

Nükleer Cisimler 386

Nükleolus ve rRNA 387

Polikomb cisimcikler: Transkripsiyonel baskılanma merkezleri 390

Cajal cisimcikleri ve benekler: snRNP'lerin işlenmesi ve depolanması 391

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 392

SORULAR 394

KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 394

Bölüm 11 Protein Tasnifi ve Taşınması

Endoplazmik Retikulum, Golgi Aygıtı ve Lizozomlar 397

Endoplazmik Retikulum 397

Endoplazmik retikulum ve protein salgılanması 398

Proteinlerin endoplazmik retikuluma hedeflenmesi 400

Anahtar Deney

Sinyal Hipotezi 402

Proteinlerin ER zarına katılması 405

ER'de protein katlanması ve işlemlenmesi 411

ER'de kalite kontrolü 414

Düz ER ve lipid sentezi 418

Protein ve lipidlerin ER'den dışarı çıkışları 420

Golgi Aygıtı 421

Golgi'nin organizasyonu 422

Proteinlerin Golgi içerisinde glikozillenmesi 423

Golgideki lipid ve polisakkarid metabolizması 426

Proteinlerin tasnifi ve Golgi aygıtından dışarı gönderilmesi 427

Vezikülle Taşınma Mekanizması 430

Vezikülle taşınmayı anlamaya yönelik deneysel yaklaşımlar 430

Kargo seçimi, kaplayıcı proteinler ve vezikül tomurcuklanması 431

Vezikül kaynaşması 435

Lizozomlar 436

Lizozomal asit hidrolazlar 436

Moleküler Tıp

Gaucher Hastalığı 437

Endositoz ve lizozom oluşumu 438

Fagositoz ve otofaji 440

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 441

SORULAR 443

KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 444

Bölüm 12 Mitokondri, Kloroplastlar ve Peroksizomlar 447

Mitokondri 447

Mitokondri organizasyonu ve işlevi 448

Mitokondrinin genetik sistemi 450

Moleküler Tıp

Mitokondri Hastalıkları: Leber'in Kalıtımsal Optik Nöropatisi 452

Proteinlerin içeri girişi ve mitokondrinin yapılanması 453

Mitokondri lipidleri 457

Metabolitlerin iç membran boyunca taşınması 457

Kloroplastlar ve Diğer Plastidler 458

Kloroplastların yapı ve işlevi 459

Kloroplast genomu 461

Kloroplast proteinlerinin içeri girişi ve tasnifi 461

Diğer plastidler 465

Peroksizomlar 467

Peroksizomların işlevleri 468

Peroksizom yapılanması 470

Moleküler Tıp

Peroksizom Biyogenez Hastalıkları 472

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 475

SORULAR 476

KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 476

Bölüm 13 Hücre İskeleti ve Hücre Hareketi 479

Aktin Filamanlarının Yapısı ve Organizasyonu 479

Aktin filamanların yapılanması ve ayrışması 479

Aktin filamanlarının düzenlenmesi 484

Aktin filamanlarının plazma zarı ile etkileşimleri 486

Mikroviluslar 489

Hücre yüzey çıkıntıları ve hücre hareketi 490

Miyozin Motorları 493

Kas kasılması 493

Aktin ve miyozinin kas dışı hücrelerde kasılabilir yapılanmaları 498

Konvansiyonel olmayan miyozinler 500

Mikrotübüller 501

Mikrotübüllerin yapısı ve dinamik organizasyonu 501

Mikrotübüllerin yapılanması 505

Hücrelerde mikrotübüllerin organizasyonu 506

Mikrotübül Motorları ve Hareketleri 508

Mikrotübül motor proteinleri 508

Anahtar Deney

Kinezin İzolasyonu 509

Kargo taşınması ve hücre içi düzenlenme 512

Sil ve kamçılar 514

Mikrotübüllerin mitoz sırasında yeniden düzenlenmesi 517

Kromozom hareketi 518

Ara Filamanlar 520

Ara filaman proteinleri 520

Ara filamanların yapılanması 521

Ara filamanların hücre içi organizasyonu 522

Ara filamanların fonksiyonları: keratinler ve deri hastalıkları 524

Anahtar Deney

Anormal Deri Gelişimine Neden Olan Mutant Keratinlerin Ekspresyonu 525

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 526

SORULAR 528

KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 529

Bölüm 14 Plazma Zarı 531

Plazma Zarının Yapısı 531

Lipid çift tabaka 531

Plazma zar proteinleri 534

Plazma zarı bölgeleri 540

Küçük Moleküllerin Taşınması 544

Kolaylaştırılmış difüzyon ve taşıyıcı proteinler 544

İyon kanalları 546

ATP hidroliziyle desteklenen aktif taşıma 553

Moleküler Tıp

Kistik Fibrozis 557

İyon değişim derecesi (ion gradient) ile yürütülen aktif taşıma 558

Endositoz 560

Fagositoz 560

Klatrin-aracılı endositoz 561

Anahtar Deney

LDL Reseptörü 564

Klatrinden bağımsız endositoz 567

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 567

SORULAR 568

KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 569

Bölüm 15 Hücre Duvarları, Ekstraselüler Matrisk ve Hücre Etkileşimleri 571

Hücre Duvarı 571

Bakteri hücre duvarları 571

Ökaryotik hücre duvarları 573

Ekstraselüler Matriks ve Hücre - Hücre Matriks Etkileşimleri 577

Matriks yapısal proteinleri 578

Matriks polisakkaridleri 581

Adhezyon proteinleri 582

Hücre-matriks etkileşimleri 583

Anahtar Deney

İntegrinin Karakterizasyonu 584

Hücre-Hücre Etkileşimleri 587

Adhezyon bağlantıları 587

Sıkı bağlantılar 590

Aralık bağlantıları 591

Moleküler Tıp

Aralık Bağlantı Hastalıkları 593

Plazmodesmata 594

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 595

SORULAR 596

KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 597

KISIM IV Hücre Regülasyonu 599

Bölüm 16 Hücre Sinyal İletimi 601

Sinyal İletimi Molekülleri ve Reseptörleri 601

Hücre-hücre sinyal iletimi tipleri 602

Steroid hormonlar ve nükleer reseptör süperailesi 603

Nitrik oksit ve karbonmonoksid 605

Nörotransmiterler 606

Peptid hormonlar ve büyüme faktörleri 607

Ökosanoidler 608

Bitki hormonları 610

G Proteinleri ve Siklik AMP Sinyal İletimi 611

G proteinleri ve G proteini-eşlikli reseptörler 612

Anahtar Deney

G Protein-Eşlikli Reseptörler ve Koku Tespiti 613

cAMP yolağı: İkinci mesajcılar ve protein fosforilasyonu 615
Siklik GMP 618

Tirozin Kinazlar ve MAP Kinaz, PI 3-Kinaz ve Fosfolipaz C/Kalsiyum Yolakları ile Sinyal İletimi 619
Reseptör tirozin kinazlar 619
Reseptör olmayan tirozin kinazlar 622
Moleküler Tıp
Kanser: Sinyal İletimi ve *ras* Onkogenleri 625
MAP kinaz yolakları 626
PI 3-kinaz/Akt ve mTor yolakları 630
Fosfolipaz C ve Ca^{2+} 635

Transkripsiyon Faktörleri ile Eşlenik Reseptörler 637
TGF-β / Smad yolağı 637
NF-κB sinyal iletimi 638
Hedgehog, Wnt ve Notch yolakları 638

Sinyal İletimi Dinamikleri ve Ağları 641
Geri besleme döngüleri ve sinyal iletimi dinamikleri 641
Ağlar ve çapraz iletişim 642

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 644
SORULAR 646
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 647

Bölüm 17 Hücre Döngüsü 651

Ökaryot Hücre Döngüsü 651
Hücre döngüsünün evreleri 652
Hücre döngüsünün hücre büyümesi ve ekstraselüler sinyaller tarafından düzenlenmesi 653
Hücre döngüsü kontrol noktaları 656

Hücre Döngüsü İlerlemesinin Düzenleyicileri 657
Protein kinazlar ve hücre döngüsünün düzenlenmesi 657
Anahtar Deney
MPF'nin Keşfi 658
Anahtar Deney
Siklinlerin Tanımlanması 661
Siklin ve siklin-bağımlı kinaz aileleri 663
Büyüme faktörleri ve G_1 Cdk'lerin regülasyonu 665
S evresi ve DNA replikasyonunun düzenlenmesi 668
DNA hasarı kontrol noktaları 669

M Evresi Olayları 670
Mitozun aşamaları 670
Mitoza giriş 673
İğ kontrol noktası ve anafaza geçiş 677
Sitokinez 678

Mayoz ve Döllenme 679
Mayoz Süreci 679
Oosit mayozunun düzenlenmesi 682
Döllenme 685

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 686
SORULAR 688
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 688

Bölüm 18 Hücre Ölümü ve Hücre Yenilenmesi 691

Programlı Hücre Ölümü 691
Apoptoz olayları 692
Anahtar Deney
Programlı Hücre Ölümü İçin Gerekli Genlerin Tanımlanması 694
Kaspazlar: apoptozun işlemcileri 695
Apotozun esas düzenleyicileri: Bcl-2 ailesi 696
Apoptozu düzenleyen sinyal yolları 698
Programlı hücre ölümünün alternatif yolakları 702

Kök Hücreler ve Erişkin Dokularının Korunması 703
Farklılaşmış hücrelerin çoğalması 703

Kök hücreler 705
Erişkin kök hücrelerin tıbbi uygulamaları 711
Pluripotent Kök Hücreler, Hücresel Yeniden Programlanma ve Rejeneratif Tıp 712
Embriyonik kök hücreleri 712
Anahtar Deney
Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü 713
Somatik hücre çekirdek nakli 715
Uyarılmış pluripotent kök hücreler 717
Somatik hücrelerin başka tip hücrelere farklılaşması 718
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 719
SORULAR 720
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 721

Bölüm 19 Kanser 723

Kanserin Gelişimi ve Nedenleri 723
Kanser türleri 723
Kanserin gelişimi 725
Kanserin nedenleri 727
Kanser hücrelerinin özellikleri 728
Hücrelerin kültürde transformasyonu 732
Tümör Virüsleri 733
Hepatit B ve C virüsleri 733
Küçük DNA tümör virüsleri 734
Herpesvirüsler 735
Retrovirüsler 736
Onkogenler 737
Retroviral onkogenler 737
Proto-onkogenler 739
Anahtar Deney
Proto-onkogenlerin Keşfi 740
İnsan kanserlerinde onkogenler 741
Onkogen ürünlerinin işlevleri 745
Tümör Baskılayıcı Genler 749
Tümör baskılayıcı genlerin tanımlanması 750
Tümör baskılayıcı gen ürünlerinin işlevleri 753
Kanser genom bilim (genomics) 757
Kanser Tedavisinde Moleküler Yaklaşımlar 758
Korunma ve erken tanı 759
Tedavi 760
Moleküler Tıp
İmatinib: *brc/abl* Onkogenini Hedef Alan Kanser Tedavisi 763
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 765
SORULAR 767
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 767

Soruların Cevapları 771
Sözlük 783
Şekiller/Fotoğraflar İçin Atıflar 803
Dizin 805

Önsöz

Hücre biyolojisinin öğrenilmesi, kapsamının çok geniş olması, yeni bilgilerin giderek artması ve alanın çok hızla ilerlemesi nedeniyle çok göz korkutucu olabilir. Bu işin asıl zorluğu ise, ayrıntılara boğularak çıkmaza girmeden, temel kavramları tam olarak öğrenebilmektir. Öğrenciler, bugün yaptıkları gibi sadece doğruları ezberlemeye yönelik değil de, hücre biyolojisinin temellerini anlamaya ve yeni ilerlemeleri kavrayabilmeye yönelik çalışmalıdırlar. Aynı zamanda içerik, öğrencilerin düşünsel olarak ilgisini çekecek şekilde ve gelecekteki çalışmalarla ilgili sağlam bir temel oluşturacak, yeterli derinlikte sunulmalıdır. *Hücre,* bu kavram ve detayları günümüz öğrenci ve öğretmenlerinin ihtiyaçlarını bir denge içinde karşılayacak şekilde kurgulanmıştır.

Hücre kitabının Yedinci Baskısı, öğrencilere ana amacı olan, modern hücre biyolojisinin ilke ve kavramlarını anlamaları konusunda yardımcı olurken, bu hızla gelişen alanda yapılan araştırmaların heyecan ve öneminin anlaşılmasına zemin hazırlamaktadır. Hücre ve moleküler biyolojiyi anlamamız son üç yılda birçok yönden oldukça ilerlemiş ve bu önemli gelişmeler kitabın güncel baskısında birleştirilmiştir. Genomiks ve proteomiks alanlarındaki bu çok çarpıcı ilerlemelerin bir bölümü halen gelişmeye devam etmektedir. Bu güncel baskıda yeni bir bölümde—Genomiks, Proteomiks ve Sistemler Biyolojisi—bu hızla gelişen alanlara odaklanılmış ve yeni gelişmekte olan bir alan olan sentetik biyolojideki tartışmalara da yer verilmiştir. Son baskıda yer verilen diğer dikkate değer gelişmeler; yüksek çözünürlüklü mikroskopi, CRISPR/Cas sistemi tarafından genom düzenlemesi, epigenetik, nükleustaki kromozom bölgelerinin organizasyonu, prionlar ve Alzhemier hastalığı ile ilgili güncellenmiş tartışmalardır.

Hücre'nin Yedinci Baskısı'nda yukarıda bahsedilenler ve diğer gelişmeler, yalnızca güncel bilgilerin tazelenmesi şeklinde değil, öğrencilerin alanımızdaki araştırmaların ve aşılması gereken güçlüklerin heyecanını hissetmelerine olanak sağlayacak sağlayacak şekilde eklendi. "*Hücre*" kitabının aynı zamanda, hücre ve moleküler biyoloji dersini ilk defa alan üniversite öğrencileri için bile anlaşılabilir ve okunabilir olmasını sağlamak için detayları azaltmaya ve kavramlara odaklamaya çalıştım. *Hücre*'nin ayırt edici özellikleri ise, sırasıyla, klinik uygulamaları vurgulayan ve çığır açan araştırma makalelerini açıklayan, Moleküler Tıp ve Anahtar Deney yazılarıdır. Bu yazılar, metin boyunca tartışılan ek deneyler ile birlikte, öğrencilerin alanımızdaki geliştirmelerin nasıl yapıldığı ile ilgili bir bakış açısı kazanmalarını ve hipotezlerin nasıl şekillendirdiği ve sonuçların nasıl yorumlandığını algılamalarını sağlar. Daha önceki baskılardaki gibi, her bölüm sonuna ilgili alanların vurgulanması veya

tıbbi merakı olanlar için, küçük "Bilgi İçin" kutucukları eklenmiştir. Yanısıra, kitabın arkasında her bölümün sonunda yer alan soru gruplarının cevapları yer almaktadır. *Hücre*'nin odağının deneysel analizler olarak devam etmesi için veya deney sonuçlarının yorumlanması konusunda düşünmeleri ve ilgili bölümü gözden geçirmeleri için sorulmuştur. Bu baskının bir başka yeni özelliği ise Eğitici Kaynakları Kütüphanesi' ne Veri Analizi Problemleri'nin eklenmesidir. Bu problemlerde orijinal araştırma makalelerindeki veriler ve şekiller yer almaktadır. Böylece öğrenciler deneysel yöntemleri ve sonuçlarını analiz etmeye yönlendirilmektedir. Ayrıca, tartışmalar için mükemmel bir materyal oluşturmakta ve öğrencilere aktif öğrenme için mükemmel fırsatlar sunmaktadır.

Yazmamın en önemli amacı, modern hücre ve moleküler biyoloji araştırmalarındaki keyfi ve zorlukları aşma heyecanını okuyucuyla paylaşmaktır. Alanımızdaki olanaklar her zamankinden daha fazladır. *Hücre*'nin günümüz öğrencilerinin gelecekteki yayınlara temel oluşturacak araştırmalara yönlenmesine katkı sağlamasını umuyorum.

Teşekkür

Öncelikle Alexandra Adams'a *Hücre*'nin Yedinci Baskısı'nın tamamını titizlikle incelediği için minnettarım. Bu kitap, önceki baskıyı okuyan eleştirmenler, meslektaşlar ve eğitimcilerin tarafından yapılan yorum ve önerilerden faydalanılarak hazırlanmıştır. Aşağıdaki kişilere değerli yorum ve önerileri için teşekkür etmekten memnuniyet duyarım:

Sage Arbor*	*Marian University*
Rebecca Balis	*Marian University*
Esther Biswas-Fiss	*Thomas Jefferson University*
Edward Bonder	*Rutgers University*
Lucinda Carnell	*Central Washington University*
Xiao-Wen Cheng	*Miami University*
Heather Cook*	*Wagner College*
Gary Coombs*	*Waldorf College*
Paul Davis	*University of Nebraska at Omaha*
Jennifer Freytag*	*The Sage Colleges*
Michael Garcia	*University of Missouri*
David Gardner	*Marian University College of Osteopathic Medicine*
Brittany Gasper	*Florida Southern College*
Mark Grimes	*University of Montana*
Karen Guzman	*Campbell University*
Neil Haave*	*University of Alberta*

Joyce Hardy*	*Chadron State College*
Amber Heck	*Rocky Vista University College of Osteopathic Medicine*
Jose Hernandez	*Midwestern University*
Peter Hoffman	*Notre Dame of Maryland University*
Lisa Kadlec*	*Wilkes University*
Ondra Kielbasa	*Alvernia University*
Janet Kirkley	*Knox College*
Jon Lowrance	*Lipscomb University*
Kaushiki Menon	*Mt. San Antonio College*
Vida Mingo*	*Columbia College*
Craig Moyer	*Western Washington University*
Perpetua Muganda	*North Carolina A&T State University*
Laura Rhoads*	*State University of New York at Potsdam*
Robert Roberson	*Arizona State University*
German Rosas-Acosta	*The University of Texas at El Paso*
D. Scott Samuels	*University of Montana*
Ken Savage	*The University of British Columbia*
Alexander Schreiber	*St. Lawrence University*
Deborah Schulman	*Lake Erie College*
José Serrano-Mareno	*Western Washington University*
Vishal Shah	*Dowling College*
Mohammad Rafique Ud-din	*LeMoyne-Owen College*
Shannon Vandaveer	*University of Kansas*
Thomas Wolkow	*University of Colorado, Colorado Springs*
Kathleen Wood*	*University of Mary Hardin-Baylor*
Robin Young	*The University of British Columbia*

*Bölümü(leri) ve Veri Analizi Problemlerini inceleyenler.

Ayrıca yayıncımıza da devamlı destekleri için teşekkür etmekten memnuniyet duyarım. Chelsea Holabird işin yayıncılık kısmını muhteşem bir şekilde tamamladı. Jen Basil-Whitaker çok güzel bir kapak ve sayfa düzeni yarattı. Andy Sinauer, Dean Scudder ve Christopher Small ile de tekrar çalışmak gerçekten büyük bir keyifti.

Geoffrey M. Cooper

Eylül, 2015

ÇEVİRİ EDİTÖRLERİ*

Prof. Dr. Neşe ATABEY - Prof. Dr. Ersan KALAY - Prof. Dr. Meral SAKIZLI

ÇEVİRENLER*

Prof. Dr. Nurten AKARSU
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı – Ankara
Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN
Izmir Ekonomi Üniversitesi Tip Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı – Izmir
Yrd. Doç. Dr. Alper ASLAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı – Samsun
Prof. Dr. Neşe ATABEY
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı – İzmir
IBG-Izmir, Izmir Uluslararasi Biyotip ve Genom Enstitüsü, Izmir
Prof. Dr. Şükriye AYTER
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji – Ankara
Prof. Dr. Esra ERDAL BAĞRIYANIK
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı – İzmir
IBG-Izmir, Izmir Uluslararasi Biyotip ve Genom Enstitüsü, Izmir
Doç. Dr. Gülay BULUT
Bahçeşehir Üniversitesi Mühendislik ve Doğabilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü – İstanbul
Prof. Dr. Nejat DALAY
Istanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü - Istanbul
Yrd. Doç. Dr. Tuğba DİNÇER
Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji – Trabzon
Yrd. Doç. Dr. Kasım DİRİL
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik – İzmir
IBG-Izmir, Izmir Uluslararasi Biyotip ve Genom Enstitüsü, Izmir
Prof. Dr. Ersan KALAY
Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji *Anabilim Dalı – Trabzon*
Yrd. Doç. Dr. Can KÜÇÜK
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı – İzmir
IBG-Izmir, Izmir Uluslararasi Biyotip ve Genom Enstitüsü, Izmir
Prof. Dr. Güven LÜLECİ*
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji – Antalya
Yrd. Doç. Dr. Yavuz OKTAY
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı – İzmir
IBG-Izmir, Izmir Uluslararasi Biyotip ve Genom Enstitüsü, Izmir
Doç. Dr. Güneş ÖZHAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji *Anabilim Dalı – İzmir*
IBG-Izmir, Izmir Uluslararasi Biyotip ve Genom Enstitüsü, Izmir
Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK
Istanbul Üniversitesi Cerrahpasa Tip Fakültesi, Tibbi Biyoloji Anabilim Dali - Istanbul
Prof. Dr. Meral SAKIZLI*
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji *Anabilim Dalı – İzmir*
Prof. Dr. H. Ogün SERCAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı – İzmir
Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU*
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji *Anabilim Dalı – İzmir*
Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU*
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji - İzmir
Doç. Dr. Çiğdem ERESEN YAZICIOĞLU
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı – İzmir
Prof. Dr. Işık YULUĞ
Bilkent Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküller Biyoloji ve Genetik Bölümü – Ankara
Doç. Dr. Zeynep YÜCE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı – İzmir

* Soyadına göre alfabetik olarak sıralanmıştır.
** Emekli profesör

Hücre, Yedinci Baskı *Organizasyonu ve Özellikleri*

Hücre, bir sömestrde tamamlanabilecek ve öğrencilerin kitabın tüm içeriğine hâkim olmalarını sağlayacak, anlaşılır ve öğretilebilir bir metin olarak tasarlanmıştır. Öğrencilerin çoğunun daha önce organik kimya, biyokimya veya moleküler biyoloji derslerini almamış, ancak, biyolojiye giriş ve genel kimya derslerini almış olacakları varsayılmıştır. Kitabın organizasyonu ve özellikleri birçok yönden öğrencilerin konulara yaklaşımlarına ve anlamalarına yardımcı olacaktır.

Organizasyon

Hücre, her biri kendi içerisinde bağımsız dört kısma ayrılmıştır, böylece konular, sıralaması ve önem derecesi, farklı derslerin ihtiyaçları doğrultusunda kolayca değiştirilebilir.

Kısım I, hücrenin evrimi, hücre inceleme yöntemleri, hücre kimyası ve modern moleküler biyolojinin esasları ile genomiks ve sistem biyolojisinin çalışma alanları konularına temel oluşturan bölümleri kapsar. Kapsamlı bir biyolojiye giriş dersi veya moleküler biyoloji konusunda bir ders alarak kuvvetli bir temel edinmiş olan öğrenciler için bu bölümlerin bazıları atlanabilir ya da sadece gözden geçirilebilir.

Kısım II, hücre moleküler biyolojisi üzerine odaklanır ve genom organizasyonu ve dizilimi; DNA replikasyonu, tamiri ve rekombinasyon; transkripsiyon ve RNA işlenmesi; proteinlerin sentezi, işlenmesi ve düzenlenmesi konularını içeren bölümleri kapsar. Bölümlerin sırası genetik bilgi akışının yönünü izler (DNA → RNA → protein) ve bu konularda kısa ve öz ancak güncel bir bakış açısı sunar.

Kısım III, nükleus, sitoplazmik organeller, hücre iskeleti, plazma membranı ve ekstraselüler matriksin anlatıldığı, hücre yapı ve işlevine ilişkin bölümlerin ana bloklarını içerir. Kitabın bu kısmı, Kısım II'deki moleküler biyolojiyi ökaryot ilk hücreler bağlamında açıklayan bir nükleus anlatımıyla başlar ve daha sonra dışarıya doğru, sitoplazmik organeller ile hücre iskeletinden, hücre zarına ve hücre dış yüzeyine ilerler. Bu bölümler göreli olarak bağımsızdır ve belli bir ders için daha uygun olacaksa farklı bir sıralama ile kullanılabilir.

Son olarak, Kısım IV hücre sinyal iletimi, hücre döngüsü ve programlı hücre ölümü konularını kapsayan ve kök hücreler gibi hücre düzenlenmesinin heyecan verici ve hızla ilerleyen alanları üzerinde odaklanır. Kitabın bu kısmı, temel hücre regülasyon mekanizmalarındaki bozuklukların sonuçlarını irdeleyen bir kanser bölümü ile sonlanır.

Özellikler

Öğrencilerin, içeriğe hâkim olmalarını ve algılamalarını kolaylaştırmak üzere Hücre' ye bazı pedagojik özellikler eklenmiştir. Bu özellikler, bu kitaptan çalışan öğrencileri yönlendirmek üzere aşağıda özetlenmiştir.

BÖLÜMLERİN DÜZENLENMESİ Her bölüm, üç ya da beş ana kısma ayrılmıştır ve bunlar da daha sonra benzer sayıda alt bölümlere ayrılır. Her bölümün başındaki ana konuları listeleyen bir özet, ilgili bölümün içeriğine kısa bir genel bakış sağlar.

ANAHTAR TERIMLER VE SÖZLÜK Anahtar terimler her bölümde, ilk tanımlandıkları yerde koyu yazılarak belirtilmiştir. Anahtar terimler, bölüm özetinde tekrarlanmış ve kitabın sonundaki sözlükte tanımlanmıştır.

RESİMLER VE MİKROSKOP GÖRÜNTÜLERİ Bir görüntüleme programı ile özenle hazırlanan tam-renkli çizimler ve mikrografiler ile metin görsel olarak tanımlandı ve desteklendi.

ANAHTAR DENEYLER VE MOLEKÜLER TIP YAZILARI Her bölümde ya iki Anahtar Deney veya bir Anahtar Deney ve bir Moleküler Tıp yazısı bulunmaktadır. Bu özellikler öğrencilerin, hem hücre ve moleküler biyolojinin deneysel temellerini, hem de bunların modern tıbba uyarlanmasını algılamalarını sağlamak üzere tasarlanmıştır. Bu bölümlerin, Anahtar Deney'e temel oluşturan orijinal makalenin bir derlemesi eşliğinde, öğrenci tartışma oturumları için de uygun bir temel oluşturacağını düşünüyoruz.

BİLGİ NOTLARI Her bölüm, metinde bahsedilen konularla ilgili dikkat çekici ve önemli noktaların kısa açıklamalar halinde sunulduğu bazı ek bilgi kutuları içerir. Ek bilgi kutuları konuyu tamamlar ve sınıf tartışmaları için başlangıç noktasını oluşturur.

BÖLÜM ÖZETLERİ Bölüm özetleri, her bölümün en önemli kısımlarına veya alt bölümlerine ait ana çerçeveye karşılık gelecek şeklinde düzenlenmiştir. Bu bölümlenmiş yapıya, konunun kısaca ancak ayrıntılı bir şekilde gözden geçirilmesini sağlamak için, o bölümde yer alan anahtar terimler listesi eşlik etmektedir.

SORULAR VE YANITLAR Her bölümün sonunda, o bölümde sunulan bilginin gözden geçirilmesini kolaylaştırmak ve öğrencilerin bu bilgileri kullanarak deneysel sonuçları öngörmelerini ve yorumlamalarını sağlamak üzere, sorular (kitabın sonunda yer alan yanıtları ile birlikte sorular) bulunmaktadır.

KAYNAKLAR Her bölümün sonundaki geniş kaynak listesi, belli başlı dergilerden seçilmiş derleme ve makalelere ulaşılmasını sağlar. Öğrencilerin ilgili makaleleri ayırt edebilmelerini kolaylaştırmak için kaynaklar bölümlere göre düzenlenmiştir. Derlemeler ve temel makaleler sırasıyla [R] ve [P] kısaltmalarıyla ayırdedilmiştir. Her ana bölüm için en yararlı derleme makale kalın olarak vurgulanmıştır.

ANİMASYONLAR VE VİDEO KONFERANSLAR Öğrencileri web sitesindeki animasyonlara ve videolara yönlendirilmektedir. Bu kutular aynı zamanda tanımlamaları ve Web bağlantılarını (URL'leri) da içermektedir. Bölüm özetlerinde metin içindeki animasyon ve videolar için referanslar da yer almaktadır.

KISIM I

Temeller ve Esaslar

Bölüm 1 **Hücrelere ve Hücre Araştırmalarına Genel Bir Bakış**

Bölüm 2 **Moleküller ve Zarlar**

Bölüm 3 **Biyoenerjetik ve Metabolizma**

Bölüm 4 **Moleküler Biyolojinin Temelleri**

Bölüm 5 **Genomik, Proteomik ve Sistem Biyolojisi**

BÖLÜM 1

Hücrelere ve Hücre Araştırmalarına Genel Bir Bakış

Hücrelerin Kökeni ve Evrimi 4

Deneysel Model Olarak Hücreler 17

Hücre Biyolojisinin Araçları 23

Ananahtar Deney
HeLa Hücreleri 39

Moleküler Tıp
Virüsler ve Kanser 41

Hücrelerin moleküler biyolojisini anlamak, biyolojik bilimlerin en aktif ve temel araştırma alanlarından biridir. Bu, sadece temel bilimler açısından değil, aynı zamanda hücre, moleküler biyoloji, tıp, biyomedikal mühendislik, biyoteknoloji ve tarımdaki birçok uygulama alanı için de doğrudur. Özellikle bireysel tüm genomun diziliminin kısa sürelerde elde edilebilmesi, hücre ve moleküler biyolojideki gelişmeler tıp uygulamalarında yeni ufuklar açmıştır. Çarpıcı örnekler arasında; kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurmaya hedeflenmiş özgün ilaçların geliştirilmesi ile, diyabet, Parkinson hastalığı, Alzahimer hastalığı, omurga yaralanmaları ve kalp hastalıklarında hasar gören dokunun yerini almak üzere kök hücrelerin kullanılması yer alır.

Hücre ve moleküler biyoloji hızla büyüyen bir araştırma alanı oluşturduğu için, şu andaki bilgi düzeyimiz kadar, bunlara ulaşmamızı sağlayan deneysel temelleri anlamak da önemlidir. Bu nedenle, bu bölümde hücrelerin bazı temel özellikleri yanı sıra, hücrelerin nasıl incelendiği üzerinde de durulacaktır. Hücreler arasındaki farklılıkların ve benzerliklerin ayrımını yapabilmek, hücre biyolojisini anlamada önemli bir yer tutar. Bu bölümün ilk kısmında günümüz hücrelerinin benzerlikleri ve farklılıkları, ortak atadan evrimleştikleri göz önünde bulundurularak tartışılmıştır. Bir yandan, tüm hücreler evrim süresince korunmuş ortak temel özelliklere sahiptirler. Örnek olarak, tüm hücreler genetik materyel olarak DNA kullanırlar, plazma zarıyla kuşatılmışlardır ve enerji metabolizması için aynı basit mekanizmaları kullanırlar. Diğer yandan, günümüz hücreleri çeşitli farklı yaşam biçimleri geliştirmişlerdir. Bakteri, amip ve maya gibi birçok canlı, kendi başına çoğalabilen tek hücrelerden oluşurlar. Daha karmaşık organizmalar, farklı hücrelerin belirli görevleri yerine getirmek üzere özelleştiği, koordine bir şekilde işlev gören hücre topluluklarından oluşmuştur. Örneğin, insan bedeni, her biri; hafıza, görme, hareket ve sindirim gibi birbirinden farklı işlevler için özelleşmiş 200'den fazla çeşitte hücreye sahiptir. Birçok farklı tip hücrenin sergiledikleri farklılıklar oldukça çarpıcıdır, insan beyin hücresiyle bir bakteri arasındaki farklılığı bir düşünün.

Farklı tipteki hücrelerin temel benzerlikleri, bir hücre türüne ait deneylerden öğrenilen temel ilkelerin diğer hücre tipleri için de öngörülmesine ve genelleştirilmesine olanak veren, hücre biyolojisinde birleştirici bir tema oluşturur. Birkaç tip hücre ve organizma, hücre ve moleküler biyolojinin farklı yönlerini incelemek için yaygın bir şekilde kullanılır; bu bölümün ikinci kısmında, söz konusu hücreleri deneysel model olarak değerli yapan bazı özellikleri tartışılmıştır. Sonuç olarak, hücre biyolojisindeki ilerlemelerin, ağırlıklı olarak, bilim insanlarının yeni incelemeler veya yeni tip deneyler yapabilmelerini sağlayan deneysel gereçlerin varlığına bağlı olduğu bilinmelidir. Bu nedenle bu giriş bölümü, hücre yapı ve işlevi hakkında

bugünki anlayışa ulaşmamızı sağlayan bazı tarihsel gelişmelerin derlenmesi ve hücre çalışmalarında kullanılan bazı deneysel yaklaşımların tartışılmasıyla sonlanmaktadır.

Hücrelerin Kökeni ve Evrimi

Hücreler, temelde çekirdek içerip içermediklerine göre tanımlanan iki ana sınıfa ayrılır. **Prokaryot hücreler** nükleer kılıftan yoksundurlar; **ökaryot hücreler**, genetik materyali sitoptoplazmadan ayıran bir nükleusa sahiptir. Prokaryot hücreler genellikle ökaryot hücrelerden daha küçük ve daha basit yapılıdırlar; nükleusdan yoksun olmaları yanı sıra, genomları daha az karmaşıktır, sitoplazmik organellere ve hücre iskeletine sahip değildirler (**Tablo 1.1**). Bu farklılıklara rağmen, günümüz tüm hücrelerinin, başlangıçtaki tek bir ortak atadan türediklerini belirtir şekilde, hem prokaryotların hem de ökaryotların yaşamı aynı temel moleküler mekanizmalarla yönetilir. İlk hücre nasıl oluştu? Günümüz hücrelerinin karmaşıklığı ve farklılıkları nasıl gelişti?

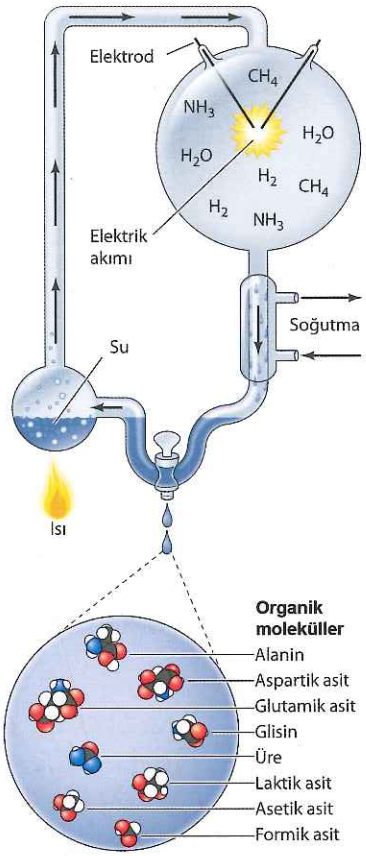
İlk hücre

Öyle görülüyor ki, yaşam ilk olarak, en az 3.8 milyar yıl önce, Yerküre'nin oluşumundan yaklaşık 750 milyon yıl sonra ortaya çıktı. Yaşamın nasıl ortaya çıktığı ve ilk hücrenin nasıl oluştuğu, bu olaylar laboratuvarlarda tekrarlanamadığı için hep bir spekülasyon konusu olmuştur. Bununla birlikte, bir kaç deneysel yöntem, sürecin bazı aşamalarına ilişkin önemli kanıtlar sağlamıştır.

İlkel Yerküre atmosferinde var olduğu düşünülen koşullarda basit organik moleküllerin oluşabildiği ve kendi kendine makro moleküllere polimerize oldukları ilk kez 1920'li yıllarda önerilmiştir. Yaşamın oluşmaya başladığı zamanda, Yerküre atmosferinin çok az veya hiç serbest oksijen içermediği, esas olarak CO_2 ve N_2'den ibaret olduğu ve daha az miktarlarda H_2, H_2S ve CO gibi gazları içerdiği düşünülmektedir. Böyle bir atmosfer, güneş ışını veya elektrik boşalması gibi bir enerji verildiğinde, organik moleküllerin kendiliğinden oluşabildiği redükleyici bir ortam sağlar. Organik moleküllerin kendiliğinden oluşumları, deneysel olarak ilk kez 1950'lerde, Stanley Miller'in (o zamanlar lisansüstü öğrenci) su varlığında, H_2, CH_4 ve NH_3'den oluşan bir karışıma elektriksel kıvılcımlar göndererek, bazı amino asitler de dahil çeşitli organik moleküllerin oluştuğunu göstermesiyle kanıtlanmıştır (**Şekil 1.1**). Her ne kadar, Miller'in deneyleri ilkel Yerküre şartlarını tam olarak karşılamıyorsa da, ilk canlı organizmaların ortaya çıkışına temel materyal sağlayan organik moleküllerin kendiliğinden sentezlendiğine inanılabileceğini açıkça ortaya koymuştur.

Tablo 1.1 Prokaryot ve Ökaryot Hücreler

Özellik	Prokaryot	Ökaryot
Nükleus	Yok	Var
Tipik bir hücrenin çapı	$\approx 1\ \mu m$	10-100 μm
Sitoplazmik organeller	Yok	Var
DNA içeriği (baz çifti)	$1x10^6$ ile $5x10^6$	$1.5x10^7$ ile $5x10^9$
Kromozom	Tek çembersel DNA molekülü	Çok sayıda doğrusal DNA molekülleri



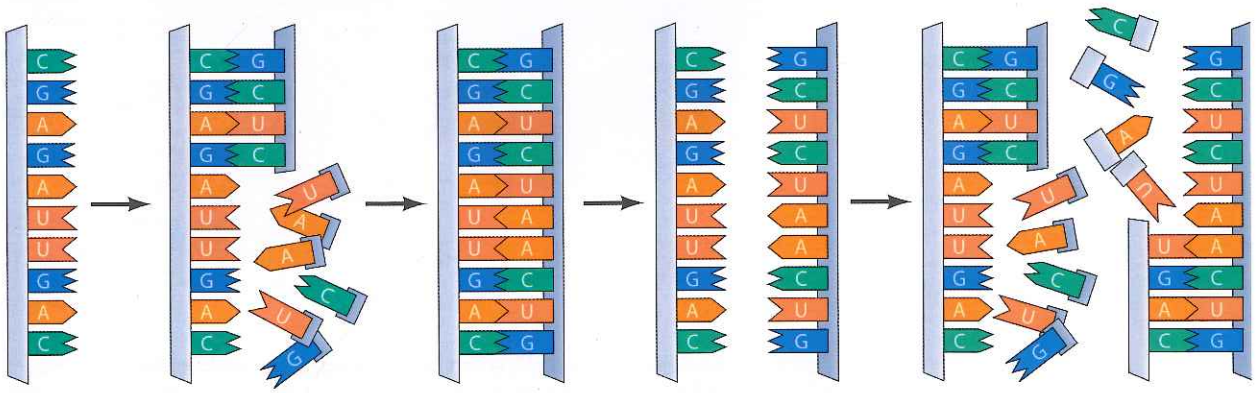
Şekil 1.1 Organik moleküllerin kendiliğinden oluşumu Elektrik kıvılcımları verilen CH_4, NH_3 ve H_2'den oluşmuş bir atmosfere su buharı püskürtüldü. Reaksiyon ürünlerinin analizi, alanin, aspartik asit, glutamik asit ve glisin dahil çeşitli organik moleküllerin oluşumunu ortaya çıkardı.

Evrimde ikinci basamak, makromoleküllerin oluşumudur. Makromoleküllerin monomerik yapı taşlarının makul prebiotic koşullarda kendi kendilerine polimerleştikleri gösterilmiştir.

Örneğin, kuru amino asit karışımlarının ısıtılması, polipeptidlere polimerize olmalarına yol açar. Ancak, yaşamın başlangıcını sağlayan makromolekülün önemli özelliğinin, kendini kopyalama yetisi olması beklenir. Sadece, kendi yeni kopyalarının sentezini yapabilecek bir makro molekül çoğalabilme ve daha fazla evrimleşme yeteneğine sahip olacaktır.

Günümüz hücrelerinde bulunan en önemli iki majör bilgi taşıyan makromolekül sınıfından (nükleik asitler ve proteinler) sadece nükleik asitler kendi kendini-eşleme yeteneğine sahiptirler. Nükleik asitler, tamamlayıcı nükleotidlerin özgül eşleşmesi sayesinde kendi sentezlerine kalıplık yapabilmektedir. (**Şekil 1.2**). Moleküler evrimin anlaşılmasında kritik bir aşamaya, 1980'li yılların başında, Sid Altman ve Tom Cech'in laboratuvarlarında RNA'nın, nükleotid polimerleşmesi de dahil bazı kimyasal reaksiyonları katalizleyebildiğinin gösterilmesiyle ulaşıldı. Daha sonraki çalışmalar, RNA'nın bilinen katalitik aktivitelerinin alanını genişletmiş, bir RNA kalıbından yeni bir RNA ipliğinin sentezini yöneten RNA molekülleri tanımlanmıştır. Böylece RNA, benzersiz şekilde, hem kendi replikasyonunu katalizleyip hem de kendi sentezine kalıplık yapabilmektedir. Sonuç olarak, RNA'nın ilk genetik sistem olduğuna inanılmakta ve kimyasal evrimin erken evrelerinin kendini eşleyen RNA moleküllerinden temel aldığı sanılmaktadır: Evrimin **RNA dünyası** olarak adlandırılan bir dönem. RNA ile amino asitlerin kurala bağlı etkileşimleri daha sonraları günümüz genetik şifresine gelişmiş, nihayet genetik madde olarak DNA, RNA'nın yerini almıştır.

Daha sonra bölüm 4'de tartışılmış olduğu gibi, bütün günümüz hücreleri DNA'yı genetik materyal olarak kullanır ve DNA'nın replikasyonu ve genetik bilginin ekspresyonu için aynı temel mekanizmaları işletir. **Genler**, DNA'nın

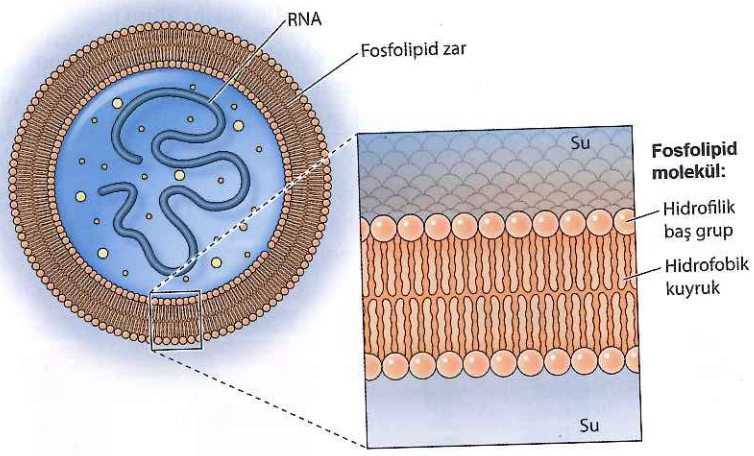


Şekil 1.2 RNA' nın kendini - eşlemesi Nükleotidler arasında tamamlayıcı eşleşmeler (adenin [A] ile urasil [U] ve guanin [G] ile sitozin [C]) komplementer olan yeni bir zincir sentezlemek üzere, tek zincirli bir RNA'ya kalıp olma imkanı verir.

protein veya RNA kodlayan segmentine karşılık gelen, kalıtımın fonksiyonel birimleridir. Genin nükleotid dizilimi **transkripsiyon** olarak adlandırılan bir işlemle RNA'ya kopyalanmaktadır. Protein kodlayan RNA'ların nükleotid dizilimleri, **translasyon** olarak adlandırılan bir işlemle proteinin amino asit dizilimini beirlemek için kullanılır.

İlk hücrenin, kendini eşleyen RNA'nın **fosfolipidlerden** oluşan bir zarla kuşatılmasıyla ortaya çıktığı varsayılmaktadır (Şekil 1.3). Bir sonraki bölümde ayrıntılı olarak tartışıldığı üzere, fosfolipidler, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin plazma zarları da dahil olmak üzere, günümüz biyolojik zarlarının temel bileşenidir. Zar oluşturan fosfolipidlerin en önemli özellikleri **amfipatik** moleküller olmalarıdır, bunun anlamı, molekülün bir kısmı suda çözünebilirken diğer kısmının çözünmemesidir. Fosfolipidlerin, fosfat içeren ve suda çözünen (***hidrofilik***) baş gruplarıyla bunlara bağlı, suda-çözünmeyen (***hidrofobik***) uzun hidrokarbon zincirleri bulunur. Suya konulduğunda fosfolipidler kendiliklerinden, fosfat içeren baş grupları dışta suyla temasta, hidrokarbon kuyrukları içeride birbirleriyle temas edecek biçimde bir çift tabaka oluşturmak üzere bir araya toplanırlar. Böyle bir fosfolipid çift tabakası, iki sulu bölme arasında dayanıklı bir bariyer oluşturur–örneğin; hücrenin iç kısmını dış çevresinden ayıran.

Kendini eşleyen RNA'nın ilişkili diğer moleküllerle birlikte fosfolipid zar içerisine alınması, kendini çoğaltabilen ve daha ileri evrimleşebilen bir birim olarak korunmalarını sağlamıştır. Aynı zamanda RNA-yönetimli protein sentezi de gelişmiş olabilir ve bu durumda, ilk hücrenin, kendini-eşleyen RNA ile onun kodladığı proteinlerden oluştuğu söylenebilir.



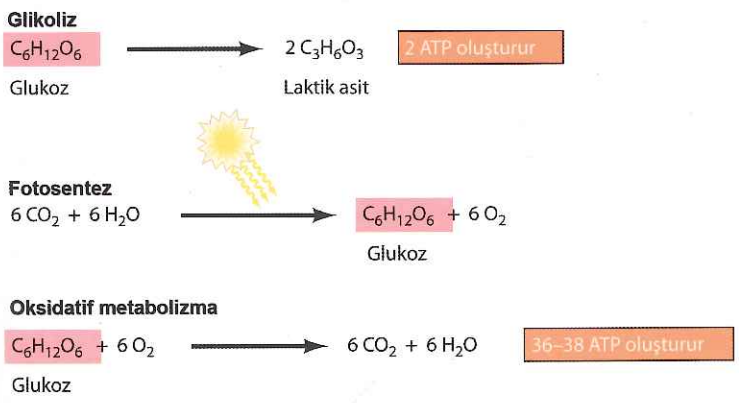
Şekil 1.3 Kendini eşleyen RNA'nın bir fosfolipid zar ile kuşatılması İlk hücrenin, kendini eşleyen RNA'nın ve ilişkili moleküllerin, fosfolipidlerden oluşan bir zarın içinde kuşatılmasıyla ortaya çıktığı düşünülmektedir. Her bir fosfolipid molekülü hidrofilik bir baş gruba bağlı iki uzun hidrofobik kuyruğa sahiptir. Hidrofobik kuyruklar lipid çift tabakaya gömülürken, hidrofilik başlar zarın her iki yanında suya açıktır.

Metabolizmanın evrimi

Hücreler, bir organik moleküller denizinden köken aldıkları için, besin ve enerjiyi doğrudan sağlayabiliyorlardı. Bu durum süremezdi ve hücrelerin, enerji elde etmek ve çoğalmak için gerekli molekülleri sentezleyecek mekanizmalar geliştirmeleri gerekliydi. Metabolik enerjinin elde edilmesi ve denetimli kullanımı tüm hücresel aktivitelerin temelidir ve enerji metabolizmasının ana yolakları (Bölüm 3'de detaylarıyla ele alındı) günümüz hücrelerinde büyük oranda korunmuştur. Tüm hücreler, hücresel bileşenlerini sentezlemek ve hareket gibi enerji gerektiren diğer etkinliklerini sürdürmek için, metabolik enerji kaynağı olarak **adenozin 5'-trifosfat (ATP)** kullanırlar. Hücrelerin ATP üretimi için kullandıkları mekanizmalar; glikoliz, fotosentez ve oksidatif metabolizmanın evrimsel gelişimi şeklinde üç aşamada ortaya çıkmıştır (Şekil 1.4). Bu metabolik yolakların gelişimi Yerküre atmosferini değiştirmiş ve evrimin yönünü etkilemiştir.

Yerküre'nin başlangıçtaki anaerob atmosferinde, enerji üreten ilk reaksiyonların, organik moleküllerin oksijen yokluğunda parçalanmasını kapsadığı varsayılıyor. Bu reaksiyonlar olasılıkla, glukozun net iki ATP molekülü kazancıyla laktik asite anaerob yıkımı olan günümüz **glikoliz** reaksiyonlarının bir biçimiydi. Tüm günümüz hücrelerinin, hücre içi kimyasal enerji kaynağı olarak ATP kullanmaları ve glikoliz yapıyor olmaları bu reaksiyonların evrim sürecinde oldukça erken ortaya çıktıkları görüşüyle uyuşmaktadır.

Glikoliz, önceden oluşan organik moleküllerin (örn., glukoz) yapılarındaki enerjinin, daha sonra metabolik reaksiyonların yürütülmesi için enerji kaynağı olarak kullanılacak olan ATP'ye dönüşebilmesi için bir mekanizma sağlamıştır. Hücreleri, önceden yapılmış organik molekülleri kullanma zorunluluğundan kurtararak güneş ışınının enerjisini alabilmelerini sağlayan **fotosentezin** ortaya çıkışının evrimde ikinci önemli aşama olduğu kanısı yaygındır. Bundan 3 milyar yıl önce ortaya çıkmış olan ilk fotosentetik bakteri, CO_2'yi organik moleküllere dönüştürmek için olasılıkla H_2S kullanmıştı - bu fotosentez yolu bazı bakterilerce halen kullanılmaktadır. CO_2'nin organik bileşiklere



Şekil 1.4 Metabolik enerji üretimi Glikoliz, glukozun laktoza anaerobik yıkımıdır. Fotosentez, güneş enerjisini CO_2 ile H_2O'dan glukozun sentezlenmesini sağlamak için kullanır ve bu arada yan ürün olarak O_2 açığa çıkar. Fotosentezden çıkan O_2, glukozun, glikolizde elde edilenden çok daha fazla enerji açığa çıkartarak CO_2 ve H_2O'ya yıkıldığı oksidatif metabolizmada kullanılır.

dönüştürülmesinde elektron ve hidrojen vericisi olarak H_2O'nun kullanılması evrimde daha sonra ortaya çıkmış ve Yerküre atmosferinin değişimi gibi önemli bir sonuca neden olmuştur. Bugün Yerküre'nin atmosferinde bolca O_2 bulunması, 2,4 milyon yıl önce, suyun fotosentetik reaksiyonlarda bol miktarda kullanımı ve yan ürün olarak serbest O_2 üretilmesinin bir sonucudur.

Fotosentezin sonucu olarak serbest kalan O_2'nin hücrelerin evrimleştiği ortamı değiştirdiği ve **oksidatif metabolizmanın** gelişmesine yol açtığı düşünülmektedir. Alternatif olarak, oksidatif metabolizma fotosentezden önce ortaya çıkmış, daha sonra atmosferik O_2'nin artması, enerji üretim reaksiyonlarında O_2 kullanan organizmalara etkin seçici avantaj sağlanmıştır. Her iki durumda da, O_2 oldukça reaktif bir moleküldür ve bu reaktiviteyi kullanan oksidatif mekanizma, organik moleküllerden enerji elde edilmesinde glikolizden çok daha etkin bir mekanizmadır. Örneğin; glukozun CO_2 ve H_2O'ya tam, oksidatif yıkımı, anaerobik glikolizle üretilen 2 ATP'ye karşın, 36 ile 38 ATP molekülüne eşit enerji sağlar (Bkz. Şekil 1.4). Günümüz hücreleri, birkaç istisna dışında, temel enerji kaynağı olarak oksidatif reaksiyonları kullanmaktadırlar.

Bilgi İçin

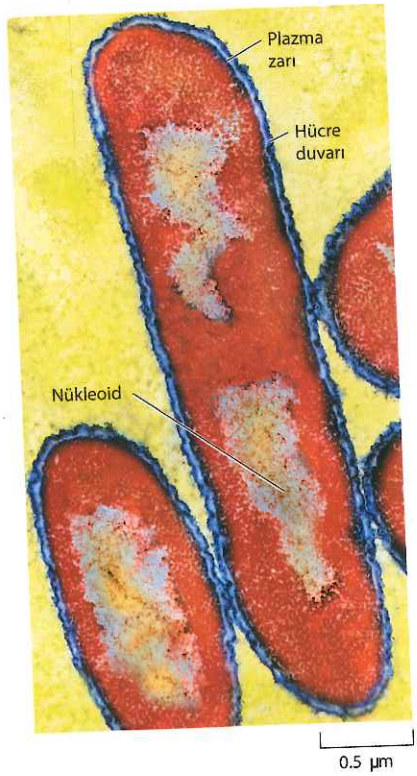
Ekstrem koşullarda organizmaların varlığı, güneş sisteminde başka bir yerde benzer ortamlarda yaşamın var olabileceği hipotezine yol açmıştır. Astrobiyoloji alanı (ya da dış dünyalardaki canlıları inceleyen bilim dalı - ekobiyoloji) dünya dışı bu yaşam belirtilerini bulmak istemektedir.

Günümüz prokaryotları

Günümüz prokaryotları, evrimin erken aşamalarında birbirinden ayrılan **arkebakteriler ve bakteriler** olmak üzere iki gruba ayrılır. Bazı arkebakteriler, bugün için alışılmadık olan ancak ilkel Dünya'da yaygınlaşmış olabilecek aşırı ortamlarda yaşarlar. Örneğin; termoasidofiller, pH değeri 2'ye kadar düşen ve sıcaklığı 80°C'ye kadar yükselen sıcak sülfür kaynaklarında yaşarlar. Günümüz genel bakteri formlarını kapsayan prokaryotlar, büyük bir canlı grubu olup, toprak, su ve diğer organizmalar (örn., insan patojenleri) gibi çok geniş bir dizi ortamda yaşarlar.

Bakteri hücrelerinin çoğu, 1-10 μm çapında küresel, çubuk şeklinde veya spiral şeklindedir. DNA içerikleri 0.6 milyon ila 5 milyon baz çifti arasındadır ve bu büyüklük, 5000 farklı proteini kodlamak için yeterlidir (**Tablo 1.2**). En büyük ve en gelişmiş prokaryotlar, fotosentez mekanizması gelişmiş olan **siyanobakteriler** dir.

Tipik bir prokaryot hücre yapısı, insan bağırsak kanalında doğal olarak bulunan ***Escherichia coli (E. coli)*** ile simgelenmiştir (**Şekil 1.5**). Hücre, yaklaşık olarak 1 μm çapında ve 2 μm uzunluğunda bir çubuk şeklindedir. Diğer birçok prokaryot gibi *E. coli* de, polisakkorid ve peptidlerden oluşan sert bir **hücre duvarı** ile çevrilidir. Hücre duvarının hemen altında, çift tabakalı fosfolipitlerden ve bağlı proteinlerden oluşan plazma zarı bulunur. Hücre duvarı gözenekli ve çeşitli moleküller tarafından kolayca geçilebilirken; **plazma zarı**, hücre içi ile dış ortam arasında fonksiyonel bir engel oluşturur. *E. coli* DNA'sı nükleoid içerisinde, tek bir çembersel moleküldür ve ökaryotik hücre nükleusunun aksine, etrafını kuşatan bir zarla sitoplazmadan ayrılmamıştır. Sitoplazma, granüler görünümüne neden olan, yaklaşık 30.000 **ribozom** (protein sentez bölgeleri) içerir.



Şekil 1.5 *E. Coli*'nin elektron mikroskop görüntüsü Hücre, bir hücre duvarıyla çevrilidir ve bunun içinde plazma zarı bulunur. DNA nükleoid içinde yer almaktadır. Yapay olarak renklendirilmiştir.

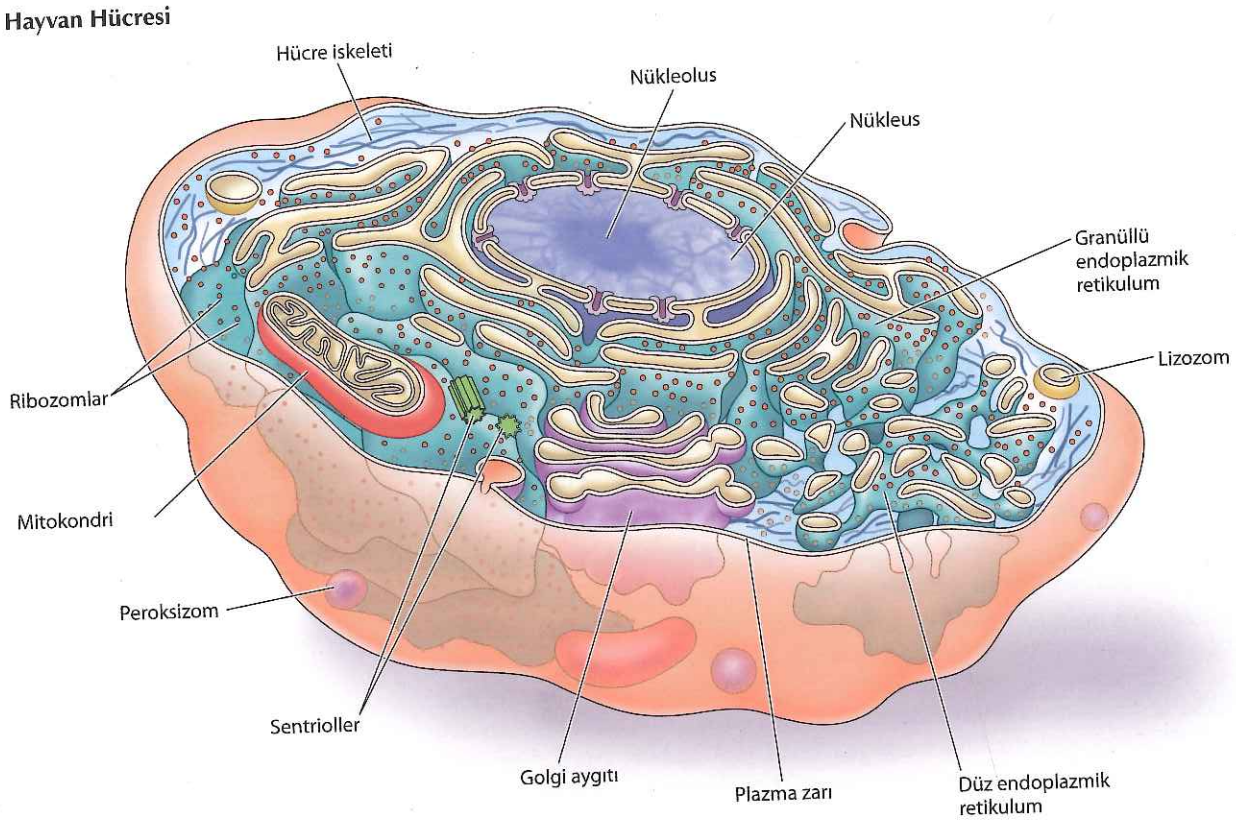
Tablo 1.2 Hücre Genomları

Organizma	Haploid DNA içeriği (Milyon baz çiftli)	Protein Kodlayan Genler
Arkebakteriler		
Methanococcus jannaschii	1.7	1700
Bakteriler		
Mycoplasma	0.6	470
E. coli	4.6	4200
Syanobakteri	3.6	3200
Tek Hücreli Ökaryotlar		
Saccharomyces cerevisiae (maya)	12	6000
Dictyostelium discoideum	34	12,000
Paramecium	72	39,500
Chlamydomonas	118	14,500
Volvox	138	14,500
Bitkiler		
Arabidopsis thaliana	125	26,000
Mısır	2200	33,000
Elma	740	57,000
Hayvanlar		
Caenorhabditis elegans (yer solucanı)	97	19,000
Drosophila melanogaster (meyve sineği)	180	14,000
Tavuk	1200	20-23,000
Zebrabalığı	1700	26,000
Xenopus tropicalis	1700	20-21,000
Fare	3000	20-22,000
İnsan	3000	21,000

Ökaryot hücreler

Prokaryot hücrelerde olduğu gibi, tüm ökaryot hücreler plazma zarı ile çevrilidir ve ribozom içerirler. Ancak, ökaryot hücreler çok daha fazla karmaşıktır ve bir nukleus ve çeşitli sitoplazmik organellere sahiptirler (Şekil 1.6). Ökaryot hücrelerin en büyük ve en çok göze çarpan organeli 5 μm çapındaki **çekirdek** dir. Çekirdek, ökaryotlarda hücrenin genetik bilgisini taşıyan ve prokaryotlardaki çembersel yapının aksine, doğrusal olarak organize olmuş DNA molekülünü içermektedir. Nukleus, DNA replikasyonunun ve RNA sentezinin olduğu bölgedir, RNA'nın proteinlere translasyonu sitoplazmadaki ribozomlarda gerçekleşir.

Nükleusa ek olarak, ökaryot hücreler sitoplazmalarında zarla çevrili çeşitli organeller içerirler. Bu organeller farklı metabolik aktivitelerin yer aldığı bölmeler oluştururlar. Ökaryotik hücreler prokaryot hücrelerden çok daha büyüktürler, genellikle en az bin kat daha büyük hücre hacmine sahiptirler.

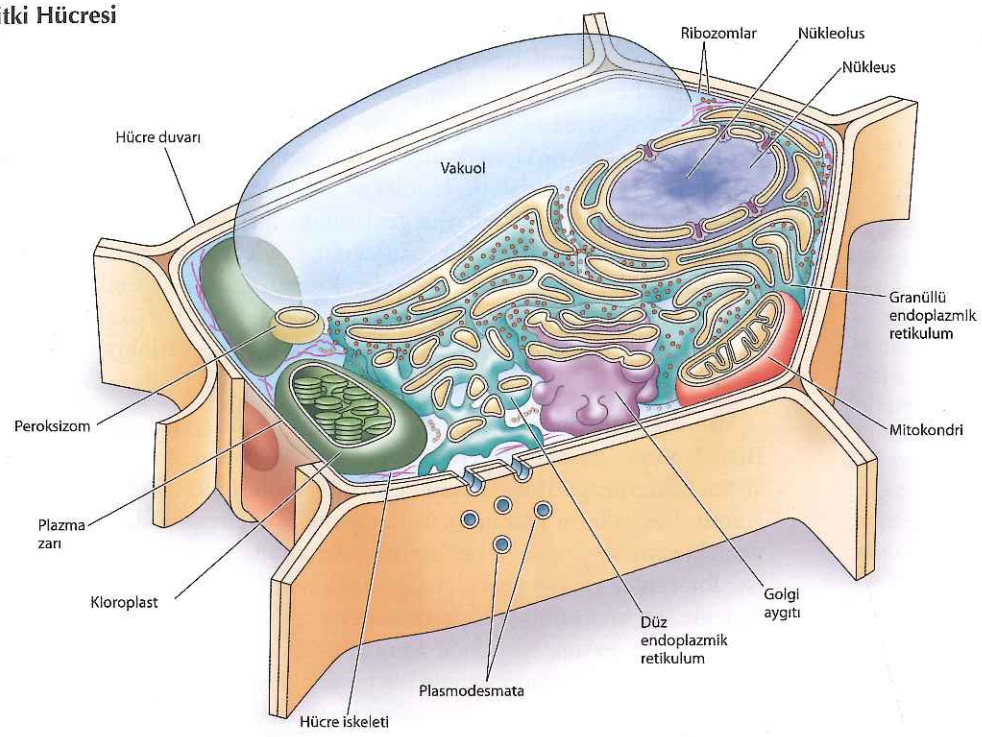


Şekil 1.6 Hayvan ve bitki hücrelerinin yapıları Hayvan ve bitki hücrelerinin her ikisi de bir plazma zarıyla çevrilmiştir ve nükleus, hücre iskeleti ve bir çok ortak sitoplazmik organel içerirler. Bitki hücreleri bir hücre duvarıyla da kuşatılmışlardır ve kloroplastlarla büyük vakuoller içerirler.

Sitoplazmik organeller tarafından oluşturulan bölümleşme, ökaryot hücrelerin etkili bir biçimde görevlerini yerine getirmelerini sağlar. Bu organellerden ikisi, **mitokondriler** ve **kloroplastlar** enerji metabolizmasında önemli rol oynarlar. Hemen hemen tüm ökaryot hücrelerde bulunan mitokondriler oksidatif metabolizmanın gerçekleştiği yerlerdir ve organik moleküllerin parçalanması sonucu ortaya çıkan ATP'nin çoğunun üretiminden sorumludurlar. Kloroplastlar, fotosentezin gerçekleştiği bölgelerdir ve sadece bitki hücrelerinde ve yeşil alglerde bulunurlar. **Lizozomlar** ve **peroksizomlar** da sırasıyla, makromoleküllerin sindirimi ve çeşitli oksidatif reaksiyonlar için özelleşmiş metabolik bölmeler oluştururlar. Buna ek olarak, bitki hücrelerinin çoğu, makromoleküllerin parçalanması ve hem artık ürünlerin hem de besinlerin depolanması gibi çok çeşitli görevleri yerine getiren **vakuolleri** içerirler.

Ökaryot hücrelerin büyüklüklerinden ve karmaşıklıklarından dolayı hücre içerisinde proteinlerin doğru hedefe taşınması zorlu bir iştir. İki sitoplazmik organel olan **endoplazmik retikulum** ve **Golgi aygıtı** özellikle salgılanacak, plazma zarına yerleşecek ve lizozomlara alınacak olan proteinlerin sınıflandırılması ve taşınmasına adanmışlardır. Endoplazmik retikulum, nükleer zardan sitoplazmanın her yanına uzanan kapsamlı bir hücre içi zar ağıdır.

Bitki Hücresi



Sadece proteinlerin işlenmesinde ve taşınımında değil, lipidlerin sentezinde de görevlidirler. Proteinler, endoplazmik retikulumdan daha ileri işleme tabi tutuldukları ve gidecekleri yere taşınmak üzere sınıflandırıldıkları Golgi aygıtına küçük zar vezikülleri içinde taşınırlar. Proteinlerin taşınımındaki bu rollerine ek olarak Golgi aygıtı, lipid sentezinde ve (bitki hücrelerinde) hücre duvarını meydana getirecek bazı polisakkaridlerin sentezinde de görevlidir.

Ökaryot hücreler diğer bir iç organizasyon düzeyine daha sahiptirler: sitoplazmada boydan boya uzanan protein ipliklerinden oluşmuş bir ağ şeklindeki **hücre iskeleti.** Hücre iskeleti, hücrenin şeklini ve sitoplazmanın genel organizasyonunu belirleyerek hücrenin yapısal çatısını oluşturur. Ayrıca, hücre iskeleti hücrelerin hareketinden (örn., kas hücrelerinin kasılması) ve hücre bölünmesi sırasında kromozomların hareketi dahil, organellerin ve diğer yapıların hücre içinde taşınmaları ile yerleştirilmelerinden sorumludur.

Ökaryotların kökeni

Ökaryot hücrelerin evriminde en kritik aşama, zarla çevrili organellerin edinilmesi ve böylece bu hücrelerin kompleks yapısının gelişiminin sağlanmasıdır. Ökaryotik organellerin, bir hücrenin başka bir hücre içinde

Bilgi İçin

Bazı günümüz deniz protistleri, algleri yutarlar ve onları kendi konakları için fotosentez yapan endosimbiyonlar olarak kullanırlar.

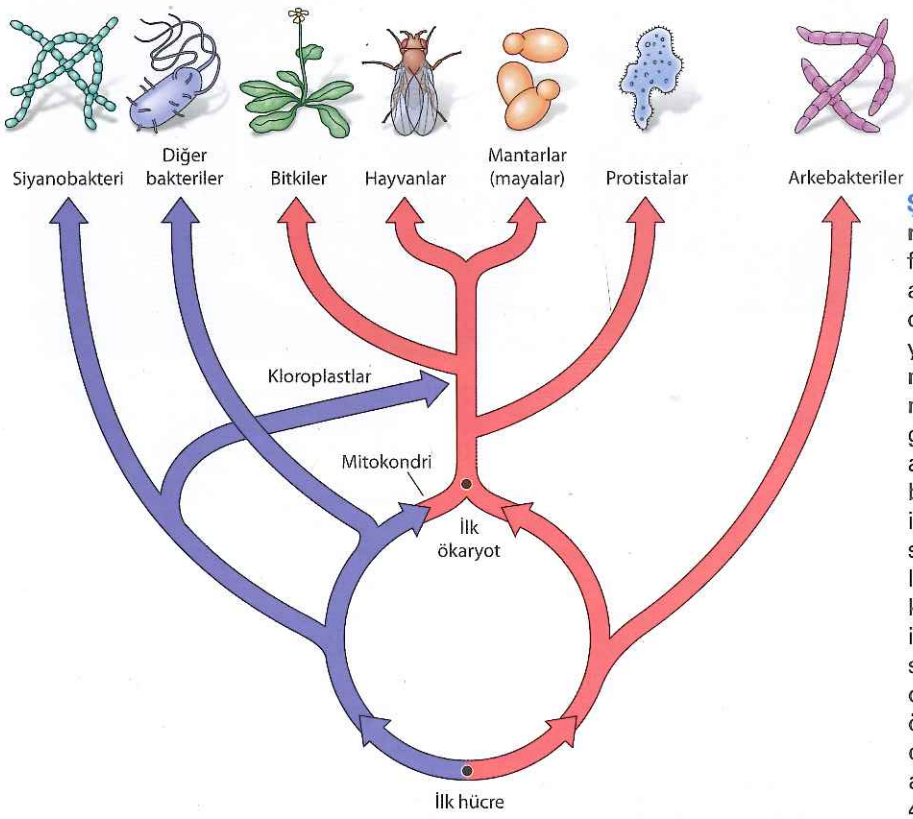
yaşaması ile -**endosimbiyoz**- geliştiği düşünülmektedir. Özellikle, ökaryotik organellerin, ökaryotların atalarının içinde yaşamış prokaryotik hücrelerden geliştiği düşünülmektedir.

Ökaryot hücrelerin endosimbiyoz ile geliştikleri yönündeki hüpotez, özellikle büyük hücrelerin içinde yaşayan bakterilerden oluştuğu düşünülen mitokondri ve kloroplast ile yapılan çalışmalar tarafından desteklenmiştir. Hem mitokondri hem de kloroplastlar büyüklük olarak bakterilere çok benzemektedir ve aynı bakterilerde olduğu gibi ikiye bölünerek çoğalırlar. En önemlisi, hem mitokondriler hem de kloroplastlar bazı bileşenlerini kodlayan kendi DNA'larına sahiptirler. Mitokondrial ve kloroplast DNA'ları organelin her bölünüşünde kendini replike eder ve kodlayan genlerin organel içerisinde transkripsiyonu ve organel ribozomlarında translasyonu yapılır. Böylece mitokondri ve kloroplastlar, hücrenin nükleer genomundan ayrı olarak kendi genetik sistemlerine sahiptirler. Ayrıca, bu organellerin ribozomları ve ribozomal RNA'ları ökaryotların nükleer genomundan kodlananlar ile karşılaştırıldığında, bakterilerinkiyle daha yakından ilişkilidirler.

Bu organellerin endosimbiyotik kökeni bugün genel kabul görmektedir. Buna göre, mitokondrilerin aerobik bakterilerden, kloroplastların da siyanobakteriler gibi fotosentetik bakterilerden evrimleştikleri düşünülmektedir. Aerob bakterilerin kazanılması anaerob hücrelere oksidatif metabolizma gerçekleştirme yeteneği sağlamıştır. Fotosentetik bakterilerin kazanılması ise, fotosentez yapma yeteneği sayesinde besinsel bağımsızlık sağlamıştır. Bu nedenle, bu endosimbiyotik birliktelikler partnerlerine büyük ölçüde avantaj sağlamış ve evrim sürecinde korunmuşlardır. Başlangıçta bu bakterilerde bulunan genlerin çoğu, zamanla hücrenin nükleer genomuna katılmıştır ve bu nedenle mitokondri ve kloroplastlarının sadece birkaç bileşeni halen organel genomları tarafından kodlanmaktadır.

Ökaryotik hücrelerin kesin kökeni, erken evrim anlayışımıza göre hala tam olarak aydınlatılmamış tartışmalı bir konudur. DNA dizi çalışmaları, arkeabakteri ve bakterilerin, günümüz ökaryotlarındaki gibi birbirinden farklı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, evrimin çok erken evresindeki bir olayın, ortak bir prokaryotik atadan köken alan iki akraba arasında farklılaşmaya neden olarak günümüz arkeabakteri ve bakterilerinin oluşmasına sebep olduğu anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, ökaryotların bakteriden mi yoksa arkeabakteriden mi geliştiğinin belirlenmesinin zor olduğu kanıtlanmıştır. Şaşırtıcı bir şekilde; bazı ökaryot genleri bakteri genlerine daha çok benzerken, diğerleri arkeabakteri genlerine daha çok benzemektedir. Bu yüzden, ökaryot genomunun tek bir atadan gelen genomu yansıtmadığı, bazı genlerinin bakterilerden ve bazı genlerinin ise arkeabakterilerden köken aldığı görülmektedir. İlginçtir ki, bilgi işleme süreci ile ilgili ökaryotik genlerin (DNA replikasyonu, transkripsiyon ve protein sentezi gibi) çoğu arkeabakteri kökenliyken, temel hücre metabolizması ile ilgili ökaryotik genler (glikoliz ve amino asit biyosentezi gibi) bakterilerden köken almaktadır.

Ökaryot genomlarının mozaik doğasını açıklamak için ileri sürülen bir hipotezde, ökaryotik genomların arkeabakteri ve bakteri genomlarının bir füzyonu sonucunda ortaya çıktığı öne sürülmektedir (**Şekil 1.7**). Bu öneriye göre, bir bakteri ve bir arkeabakteri arasındaki endosimbiyotik ilişkiyi bu iki prokaryotik genomun füzyonu takip etmiş, bakteri ve arkeabakterinin ikisinin de katkılarıyla atasal ökaryotik genom oluşmuştur. Bu hipotezin en basit versiyonu, başlangıçta arkeabakteri içinde endosimbiyotik olarak yaşayan bir

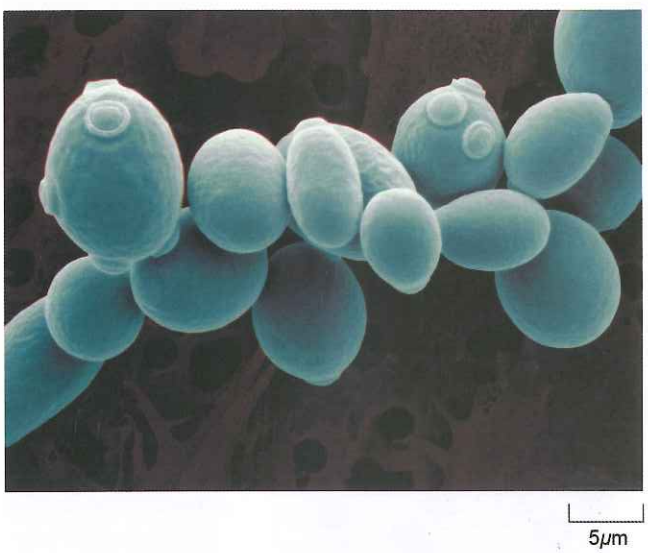


Şekil 1.7 Hücrelerin evrimi Günümüz hücreleri iki farklı soya ayrılarak arkeabakterileri ve bakterileri oluşturan yaygın bir prokaryotik ortak atadan gelişmiştir. Ökaryotik hücreler, mitokondrileri ve ökaryotik genomu oluşturan bakteri ve arkeabakterilerin genlerini barındıran aerobik bakteriler ile arkeabakterilerin endosimbiyotik ilişkisinden gelişmiş olabilir. Daha sonra, kloroplastlar siyanobakteriler ile bitkilerin atasının endosimbiyotik ilişkisi sonucu olarak evrimleşmiştir. İlk ökayotik hücre oluşum modelinin temeli M. C. Rivera and j. A. Lake, 2004. *Nature* 431: 152.

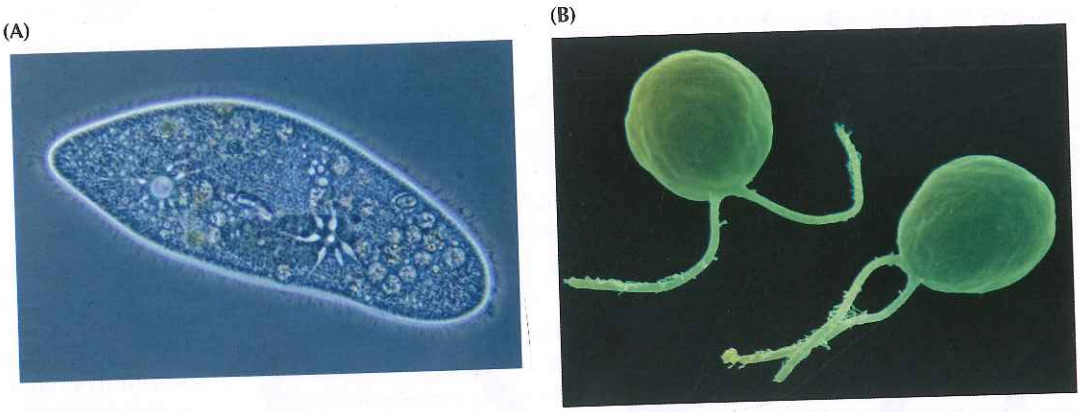
bakterinin, sadece mitokondrileri değil aynı zamanda her iki prokaryot atadan köken alan genleri içeren ökaryot hücrelerin genomunu da oluşturmasıdır.

Çok hücreli organizmaların gelişimi

Ökaryotların çoğu, bakteriler gibi, kendini eşleme yeteneğindeki tek bir hücreden oluşan tek hücreli organizmalardır. En basit ökaryotlar **mayalardır**. Mayalar birçok bakteriden çok az bir miktar daha fazla gene sahiptirler (bkz. Tablo 1.2). Mayalar, bakterilerden daha karmaşık olmalarına rağmen, hayvan ve bitki hücrelerinden çok daha küçük ve basittirler. Örneğin, yaygın olarak çalışılan bir maya olan ***Saccharomyces cerevisiae***'nın çapı yaklaşık olarak 6 μm'dir ve 12 milyon baz çiftlik bir DNA içerir (Şekil 1.8). Ancak, diğer tek hücreli ökaryotlar çok daha fazla karmaşık hücreler olup önemli ölçüde büyük ve daha karmaşık genomlara sahiptirler. Bunlar, fotosentez, hareket ve diğer canlıları yakalayıp yemek gibi çeşitli işlevleri gerçekleştirmek üzere özelleşmiş organizmaları kapsar. Örneğin, silialı bir protozoa olan *Paramecium*,



Şekil 1.8 *Saccharomyces cerevisiae*'nın taramalı elektron mikroskop görüntüsü Mayalar en basit ökaryotlardır. Mikrograf suni olarak renklendirilmiştir.

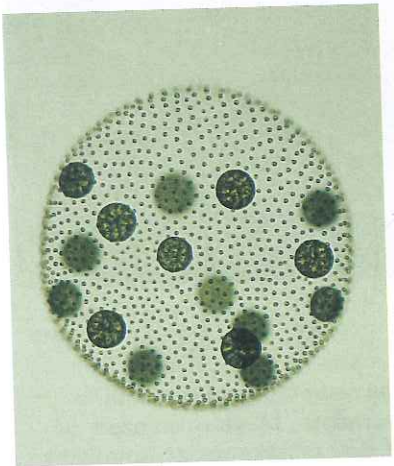


Şekil 1.9 *Paramesyum* ışık mikroskopisi ve *Klamidomonas*'ın taramalı elektron mikroskopisi. (A) *Paramesyum* ve (B) *Klamidomonas* mayalardan daha kompleks olan tek hücreli ökaryotlara örnektir.

Video 1.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v1.1
Paramecium Beslenmesi *Paramecium caudatum*, besinleri içeri çekmekte kullanılan siliaların yoğun olarak bulunduğu derin oral açıklık aracılığı ile bakterilerle ve diğer küçük hücrelerle beslenir.

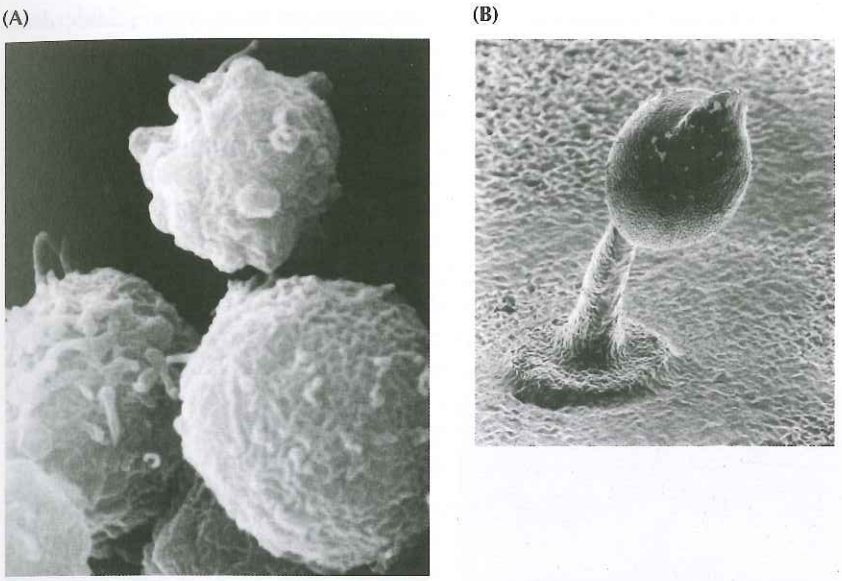
boyu 350 μm'ye kadar çıkabilen büyük ve karmaşık bir hücre olup hareket etmek ve bakteri ve mayalar ile beslenmek üzere özelleşmişlerdir (Şekil 1.9). İlginç bir şekilde, *Paramecium* genomu, hemen hemen insan genomunun iki katı kadar fazla gene sahiptir (bkz. Tablo 1.2). Bu durum, ne genom boyutunun ne de gen sayısının bir organizmanın karmaşıklığı ile doğrudan ilişkili olmadığı gerçeğini göstermektedir Geneom dizilim projesinin beklenmedik bu sonucu ilerde bölüm 5 ve 6'da tartışılacaktır. Yeşil alg *Chlamydomonas* (bkz.Şekil 1.9) gibi diğer tek hücreli ökaryotlar, kloroplastlara sahiptirler ve fotosentez yapabilmektedir.

Çok hücreli organizmaların tek hücreli ökaryotlardan evrimleşmesinin1-2 milyar yıl önce gerçekleştiği düşünülmektedir. Örneğin, algler hem tek hücreli hem de çok hücreli türler içermektedir. Çok hücreli bir yeşil alg olan *Volvox* iki farklı hücre tipine sahiptir: 16 büyük üreme hücresi ve tek hücreli *Chlamydomonas*'a benzeyen 2000 somatik hücre (Şekil 1.10). *Chlamydomonas* ve *Volvox*'in benzer boyutlarda ve karmaşıklıkta olan genomları mayaların genomundan yaklaşık 10 kat daha büyüktürler ve 14,000-15,000 gen içermektedir (bkz. Tablo 1.2). Çok hücrelilere geçişin diğer bir örneğini oluşturan amip *Dictyostelium discoideum*, besinin varlığına bağlı olarak tek hücreli ve çok hücreli formlar arasında geçiş göstermektedir (Şekil 1.11).



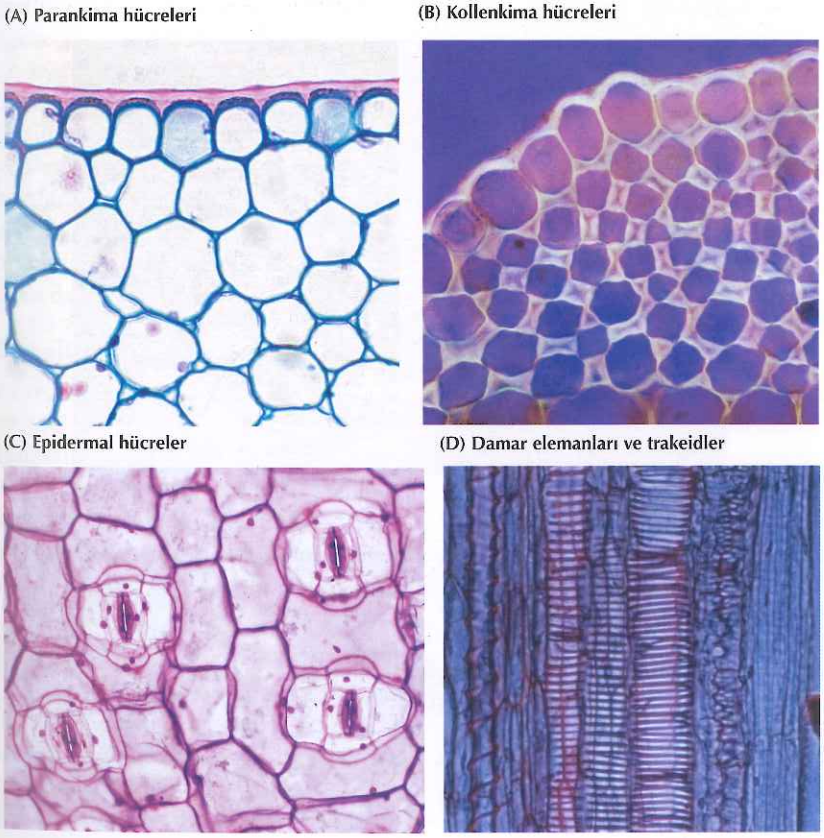
Basit çok hücreli organizmaların hücreleri arasındaki görülen artmış hücre özelleşmesi ve iş bölümü, sonrasında günümüz bitkilerini ve insanı da içine alan hayvanları oluşturan çok çeşitli hücre tiplerinde gözlenen kompleksliğe ve farklılığa yol açmaktadır. Bitkiler, hayvanlara göre daha az hücre tipinden oluşurlar. Ancak, farklı tipteki her hücre, tüm organizma için gerekli özel bir görevi yerine getirmek üzere özelleşmiştir (Şekil 1.12). Bitki hücreleri üç ana doku sisteminde organize olmuştur: destek doku, dermal doku ve damar dokusu. Destek doku, fotosentez dahil, bitkideki metabolik reaksiyonların çoğunu gerçekleştiren parenkim hücrelerini içerir.. Destek doku ayrıca, kalın

Şekil 1.10. Çok hücreli yeşil algler *Volvox* jelatinimsi bir matris içine gömülü 16 üreme hücresi ve 2000 somatik hücreden oluşur. (David Kirk'in izni ile)



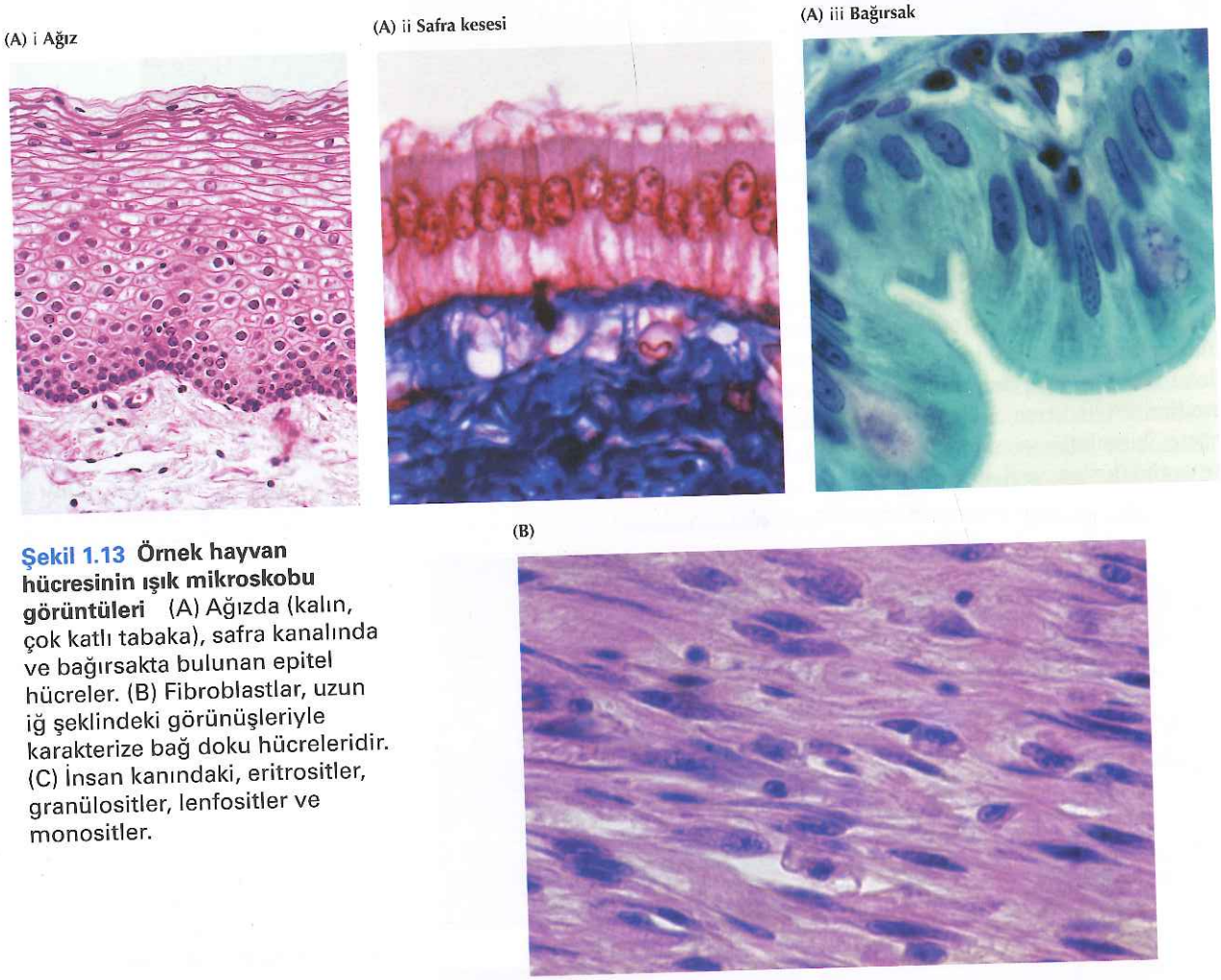
Şekil 1.11 ***Dictyostelium discoideum*** Besin yokluğunda tek hücreli amipler (A) bir araya gelerek spor yaymak üzere özelleşmiş çok hücreli sporokarplar (B). (A, David Knecht'in izni ile, Connecticut Üniversitesi)

hücre duvarları ile karakterize olan ve bitkiye yapısal destek sağlayan iki özel hücre tipini de (kollenkima hücreleri ve sklerenkima hücreleri) kapsar. Dermal doku bitkinin yüzeyini kaplar ve koruyucu bir kılıf oluşturan ve besinlerin emilimine izin veren epidermal hücrelerden oluşur. Son olarak, birkaç tip uzun hücre, besinlerin ve suyun bitki içerisinde iletiminden sorumlu olan damar sistemini (ksilem ve floem) oluştururlar.



Şekil 1.12 **Örnek bitki hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri** (A) Fotosentez ve diğer metabolik tepkimelerden sorumlu olan parankim hücreleri (mısır sapından). (B) Kalınlaşmış hücre duvarına sahip, destek için özelleşmiş kollenkim hücreleri (ıspanak yaprağı damarından). (C) Yaprak yüzeyindeki epidermal hücreler. Küçük deliklerin (stomata) yanlarında bekçi hücreleri denilen özelleşmiş hücreler bulunur. (D) Damar elemanları ve trakeidler, ksilemin kanallarını oluşturmak üzere uç uca dizilen uzun hücrelerdir.

Hayvanlarda bulunan hücreler bitkilerdekilerden belirgin bir şekilde daha fazla çeşitlilik gösterir. Örneğin; insan vücudu; epitel doku, bağ dokusu, kan, sinir dokusu ve kas olmak üzere beş ana dokunun bileşenleri olarak kabul edilen 200'den fazla farklı hücre tipinden oluşmuştur (Şekil 1.13). **Epitel hücreler**, vücut yüzeyini saran ve iç organları kaplayan tabakaları oluşturur. Koruma



Şekil 1.13 Örnek hayvan hücresinin ışık mikroskobu görüntüleri (A) Ağızda (kalın, çok katlı tabaka), safra kanalında ve bağırsakta bulunan epitel hücreler. (B) Fibroblastlar, uzun iğ şeklindeki görünüşleriyle karakterize bağ doku hücreleridir. (C) İnsan kanındaki, eritrositler, granülositler, lenfositler ve monositler.

(deri), emilim (örn., ince bağırsağı kaplayan hücreler) ve salgılama (örn., tükrük bezlerinin hücreleri) gibi farklı işlevleri gerçekleştirmek üzere özelleşmiş olan bir çok farklı epitel hücre tipi vardır. Bağ dokuları, her biri farklı hücre tiplerinden oluşmuş kemik, kıkırdak ve yağ (sırasıyla; osteoblastlar, kondrositler ve adipozitler) dokusunu kapsar. Epitel tabakasının altında yer alan ve vücutta bulunan organlar ile dokular arasındaki boşlukları dolduran gevşek bağ dokusu, diğer bir hücre tipi olan **fibroblastlardan** oluşmuştur. Kan, birkaç farklı tipte hücre içerirmektedir: oksijen taşınmasında görevli kırmızı kan hücreleri **(eritrositler)**, yangısal reaksiyonlarda ve bağışıklık yanıtında görevli beyaz kan hücreleri **(granülositler, monositler, makrofajlar ve lenfositler)**. Sinir dokusu, destek hücrelerinden ve vücudun bir ucundan diğer ucuna sinyalleri iletmek üzere yüksek oranda özelleşmiş sinir hücrelerinden veya **nöronlardan** oluşur. Göz ve kulaktaki hücreler gibi, çeşitli tipte duyu hücreleri, çevreden gelen sinyalleri almak üzere daha da özelleşmişlerdir. Son olarak, birçok farklı tip kas hücresi, güç ve hareketin oluşmasından sorumludur.

Hayvanların evrimi, açık bir şekilde, hücre düzeyinde önemli oranda çeşitlenme ve özelleşmeyi gerektirir. Tek bir döllenmiş yumurtadan başlayarak, bu denli karmaşık bir özelleşmiş hücre donanımının gelişmesini ve farklılaşmasını kontrol eden mekanizmanın anlaşılması, çağımızın hücre ve moleküler biyolojisinde karşılaşılan en önemli sorunlardandır.

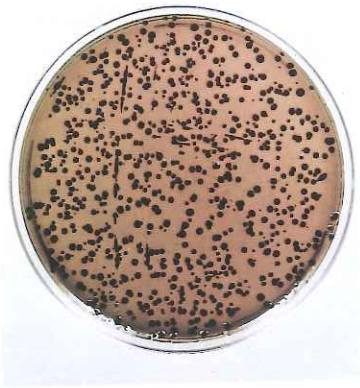
Deneysel Model Olarak Hücreler

Günümüz hücrelerinin ortak bir atadan gelmiş olmaları, deneysel bilim olarak hücre ve moleküler biyoloji için önemli anlam taşır. Tüm hücrelerin temel özelliklerinin evrim süresince korunmuş olması nedeniyle, genellikle bir tip hücre ile yapılan deneylerden elde edilen temel prensipler diğer hücrelere de uygulanabilir. Öte yandan, günümüz hücrelerinin çeşitliliğinden dolayı, deneylerin çoğu bir hücre tipinde diğerine kıyasla daha başarılı olabilir. Çeşitli türde birçok hücre ve organizma, hücre ve moleküler biyolojinin çeşitli yönlerinin araştırılması amacıyla, yaygın olarak kullanılır. Bu hücrelerin bazılarını deneysel model olarak avantajlı yapan özellikleri izleyen bölümde ele alınmıştır. Tüm genom dizilerinin ulaşılabilirliği, hücrenin moleküler biyolojisinin anlaşılmasında bu organizmaların model sistem olarak değerini daha da arttırmaktadır.

E. coli

Göreceli sadelikleri nedeniyle prokaryotik hücreler (bakteriler), biyokimya ve moleküler biyolojinin belli başlı yönlerini çalışmak için ideal modellerdir. Bakterilerin en kapsamlı çalışılan türü, uzun zamandan beri moleküler genetiğin ana mekanizmasına yönelik yapılan araştırmalar için en çok tercih edilen organizma olan *E. coli*'dir. DNA replikasyonu, genetik kod, gen ekspresyonu ve protein sentezinin anlaşılması gibi, mevcut moleküler biyoloji kavramlarının çoğu bu sıradan bakterinin incelenmesiyle sağlanmıştır.

E. coli, laboratuvar ortamında üretilip çalışılmasının kolaylığı ve nispeten basit yapısı nedeniyle moleküler biyologlar için özellikle çok kullanışlıdır. Örneğin; *E. coli*'nin genomu, yaklaşık olarak, 4.6 milyon baz çiftinden oluşur ve 4000 civarında gen içerir. İnsan genomu yaklaşık olarak bin kez daha büyüktür (yaklaşık 3 milyar baz çifti) ve 21,000 protein kodlayan gen içerdiği düşünülmektedir (bkz. Tablo 1.2). *E. coli* genomunun küçük boyutu genetik analizler için belirgin avantaj sağlar.



Şekil 1.14 Bakteri kolonileri Agar içeren ortam yüzeyinde çoğalmış *E. coli* kolonilerinin fotoğrafı.

Moleküler genetik deneyler, iyi tanımlanmış laboratuvar koşullarında *E. coli*'nin hızlı çoğalması sayesinde daha kolaylaşmıştır. En uygun kültür koşullarında *E. coli*, her 20 dakikada bir bölünmektedir. Dahası, tüm hücrelerin, başlangıçtaki tek bir hücrenin bölünmesiyle oluşturduğu klonal *E. coli* populasyonu, agarlı yarı katı ortamda büyüyen bir koloni olarak kolaylıkla izole edilebilir (Şekil 1.14). Bir gecede 10^8 kadar yüksek sayıda hücre içeren bakteri kolonileri gelişebildiğinden, penisilin gibi antibiyotiklere dirençli, mutant *E. coli* varyantlarının seçilimi hızlı ve kolaydır. Bu gibi mutantların seçilim ve analizindeki kolaylık, moleküler genetiğin temel prensiplerini açıklayan deneylerin başarısında kritik öneme sahip olmuştur, Bölüm 4'de tartışılmıştır.

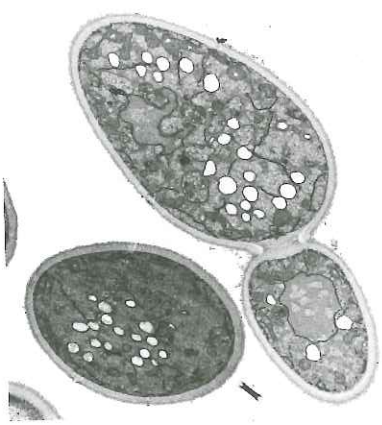
E. coli'nin en hızlı bölündüğü besin karışımları; glukoz, tuzlar ile amino asitler, vitaminler ve nükleik asit öncülleri gibi çeşitli organik bileşikleri içerir. Bununla birlikte *E. coli*, sadece tuzlar, bir azot kaynağı (amonyum gibi) ile bir karbon ve enerji kaynağından (glukoz gibi) oluşan çok daha basit bir ortamda da çoğalabilir. Tüm amino asitlerini, nükleotidlerini ve diğer organik bileşiklerini sentezlemek zorunda oldukları için, bu gibi ortamlarda bakteriler biraz daha yavaş çoğalırlar (yaklaşık 40 dakika bölünme süresi). Basitleştirilmiş ortamda bu biyosentetik reaksiyonları gerçekleştirme yeteneği, *E. coli*'yi, söz konusu biyokimyasal yolların aydınlatılmasında oldukça kullanışlı bir hale getirmiştir. Bu nedenle, *E. coli*'nin hızlı çoğalması ve basit besinsel gereksinimleri, hem moleküler biyoloji hem de biyokimyada yapılan temel araştırmaları oldukça kolaylaştırmıştır.

Mayalar

Bakterilerin, hücrenin korunmuş birçok özelliğinin çalışılması için çok değerli bir model olmalarına karşın, ökaryotlara özgü yapı ve işlev konularının araştırılması için kullanılamayacakları açıktır. En basit ökaryotlar olan mayalar *E. coli*'ninkine benzer birçok deneysel avantaja sahiptir. Bu nedenle, ökaryot hücre biyolojisinin temel özellikleriyle ilgili yapılan çalışmalar için çok önemli bir model sağlar.

En sık çalışılan maya *Saccharomyces cerevisiae*'nın genomu 12 milyon baz çiftinden oluşur ve 6000 civarında gen içerir. Mayanın genomu her ne kadar *E. coli*'ninkinden üç kat daha büyük ise de, insan gibi, daha karmaşık ökaryot genomlarından çok daha kullanışlıdır. Maya hücresi tüm basitliğine rağmen ökaryot hücrelerin tipik özelliklerini sergiler (Şekil 1.15). Nükleer zarla çevrili belirgin bir nükleusu vardır, genomik DNA'sı 16 doğrusal kromozom şeklinde düzenlenmiştir ve sitoplazmasında hücre iskeleti ve hücre içi organeller bulunur.

Mayalar laboratuvar ortamında kolaylıkla çoğaltılabilir ve *E. coli* ile başarısı kanıtlanmış moleküler genetik yaklaşımların bir çoğuyla çalışılabilir. Mayalar, bakteriler kadar hızlı çoğalmasalar da, her 2 saatte bir bölünürler ve tek bir hücreden koloni halinde çoğaltılabilirler. Sonuç olarak, mayalar, bakteri kullanılarak gerçekleştirilebilenlere benzer çeşitli genetik uygulamalarda kullanılabilirler.



Şekil 1.15 *Saccharomyces cerevisiae*'nın transmisyon elektron mikroskop görüntüsü Ökaryotik hücrelerin çalışılmasında mayalar en basit modeldir.

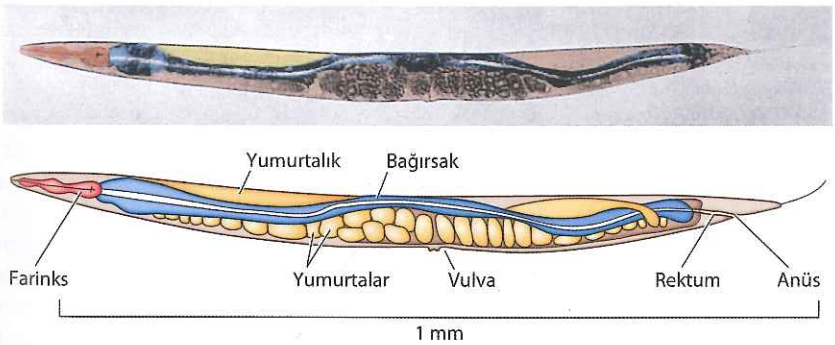
Bu özellikleri, maya hücrelerini, moleküler biyoloji açısından en geçerli ökaryotik hücre yapmıştır. İzleyen bölümlerde tartışılacağı gibi, maya mutantları; DNA replikasyonu, transkripsiyon, RNA işlenmesi, protein tasnifi ve hücre bölünmesinin düzenlenmesi dahil ökaryotlardaki birçok temel işlevin anlaşılmasında önemli olmuştur. Maya araştırmalarıyla açığa çıkan hücre yapı ve işlev kurallarının tüm ökaryot hücreler için geçerli olduğu gerçeği, moleküler hücre biyolojisinin birliğini açıkça ortaya koymuştur.

Caenorhabditis elegans

Tek hücreli mayalar, ökaryot hücrelerin araştırılmasında önemli modellerdir, fakat, çok hücreli canlıların gelişimini anlayabilmek için, hayvanlar ve bitkiler gibi daha karmaşık canlıların incelenmesi gerekir. Bir nematod olan ***Caenorhabditis elegans*** (**Şekil 1.16**), hayvan gelişiminin ve hücre farklılaşmasının araştırılmasında en yaygın kullanılan modellerden biri olmasını sağlayan önemli özelliklere sahiptir.

C. elegans genomu (yaklaşık 100 milyon baz çifti) tek hücreli ökaryotlarınkinden daha büyük olmakla beraber, birçok hayvan genomuna kıyasla daha basit ve kontol edilebilirdir. Nispeten küçük boyutlarda olmasına rağmen, *C. elegans* genomu yaklaşık 19,000 gen içermektedir ki bu, mayanın gen sayısının üç katından fazla ve protein kodlayan insan gen sayısı ile neredeyse aynıdır. Biyolojik olarak, *C. elegans* nispeten basit yapılı bir çok-hücreli organizmadır: Erişkin kurtlar sadece 959 somatik hücre ile, 1000-2000 germ hücresinden oluşmuştur. Ayrıca, *C. elegans* laboratuvarda kolayca yetiştirilebilir ve genetik olarak manipüle edilebilir.

C. elegans'ın sadeliği sayesinde, gelişim sürecini mikroskop ile detaylı olarak incelemek mümkündür. Bu analizler, erişkin kurdun tüm hücrelerinin embriyonik kökeninin ve soyunun başarıyla izlenmesini sağladı. Genetik çalışmalarla da, gelişimsel hatalardan sorumlu mutasyonların bir çoğu tanımlandı, böylece, nematod gelişimini ve farklılaşmasını denetleyen önemli genlerin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleşti. En önemlisi, benzer genlerin kompleks hayvanlarda (insan dahil) da işlevsel olduklarının bulunuşu idi ki bu, *C. elegans*'ın hayvan gelişiminin incelenmesi için önemli bir örnek olmasına yol açtı.



Şekil 1.16 ***Caenorhabditis elegans*** Nematodlar hayvan gelişiminin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. (J. E. Sulston ve H. R. Horvitz'dan alınmıştır, 1977. *Dev. Biol.* 56: 110.)

Şekil 1.17 *Drosophila melanogaster* Meyve sineği genetik ve gelişim biyolojisi çalışmalarından kilit bir modeldir.

Drosophila melanogaster

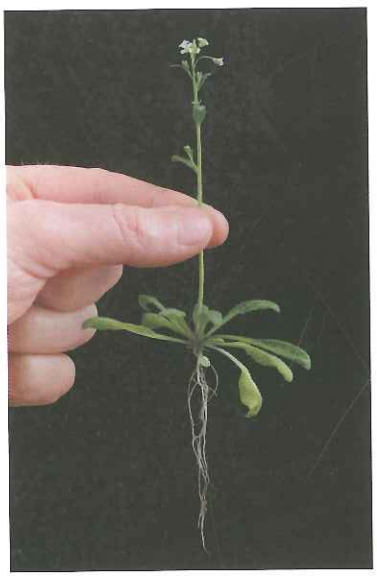
C. elegans gibi, meyve sineği ***Drosophila melanogaster*** (Şekil 1.17) de gelişimsel biyolojide çok önemli bir model olmuştur. *Drosophila* melanogaster genomu 180 milyon baz çifti ile *C. elegans* genomundan büyük olamakla birlikte, sadece 14,000 kadar gen içermektedir. Bunun da ötesinde, *Drosophila*'nın laboratuvarda kolayca bakılıp çoğaltılabilmesi ve üreme döngüsünün kısalığı (yaklaşık 2 hafta), onu genetik çalışmalar için kullanışlı bir organizma yapmaktadır. Genlerle kromozomlar arasındaki ilişki gibi bir çok temel genetik kavram, yirminci yüzyılın başlarında *Drosophila* ile yapılan çalışmalardan doğmuştur (bkz. Bölüm 4).

Drosophila ile yapılan kapsamlı genetik analizler, gelişim ve farklılaşmayı denetleyen bir çok geni ortaya çıkardı ve güncel moleküler biyoloji yöntemleri bu genlerin işlevlerinin detaylı olarak incelenmesine olanak sağladı. Sonuç olarak, *Drosophila* araştırmaları, özellikle karmaşık çok hücreli organizmaların vücut planının oluşumu açısından, hayvan gelişimini yöneten moleküler mekanizmaların anlaşılmasında olağanüstü katkı sağladı. *C. elegans*'la olduğu gibi, omurgalılarda benzer genlerin ve işlevlerin bulunuşu, çağdaş gelişimsel biyolojide *Drosophila*'nın en önemli deneysel model olarak kullanılmasını geçerli kıldı.

Arabidopsis thaliana

Bitki moleküler biyolojisi ve gelişiminin araştırılması, entellektüel ilgi kadar, hatırı sayılır ekonomik öneme sahip, aktif ve büyüyen bir alandır. Bitki genomları hayvan genomlarına kıyasla daha karmaşık bir alan kapladığından (bkz. Tablo 1.2), bitki gelişimi çalışmaları için seçilecek örnek, *C. elegans ve Drosophila*'nın bazı avantajlı özelliklerine sahip, nispeten basit bir canlı olmalıydı. Küçük, çiçekli bir bitki olan ***Arabidopsis thaliana*** (Şekil 1.18) bu kriterleri karşıladığından, bitki moleküler biyolojisi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir model olmuştur.

Arabidopsis, yaklaşık 125 milyon baz çiftinden oluşan genomu ile göze çarpmaktadır. *Arabidopsis*, toplamda yaklaşık 26,000 kadar gene sahip olmasına rağmen bu genlerin çoğu tekrar etmektedir. Bu nedenle, özgün olarak toplamda yaklaşık 15,000 geni bulunmaktadır– kopleksliği *C. elegans* ve *Drosophila*'ya benzemektedir. Ayrıca, *arabitopsis*'in laboratuvarda yetiştirilmesi nisbeten kolaydır ve bu bitkinin araştırılmasında kullanılabilecek uygun moleküler genetik yöntemler geliştirilmiştir. Bu araştırmalar, çiçek gelişimi gibi, bitki gelişiminin çeşitli yönleriyle ilgili genlerin tanımlanmasını sağlamıştır. Bu genlerin incelenmesi, bitki ve hayvan gelişimini denetleyen mekanizmalar arasında bir çok benzerlikle birlikte çarpıcı farklılıklara da işaret etmektedir.



Şekil 1.18 *Arabidopsis thaliana* *Arabidosis*, bitki moleküler biyolojisinin çalışılmasında bir modeldir.

Omurgalılar

En kompleks hayvanlar, insanları ve diğer memelileri de kapsayan omurgalılardır. İnsan genomu yaklaşık olarak 3 milyar baz çiftidir– *C. elegans*, *Drosophila* veya *Arabidopsis* genomundan 20-30 kat daha büyük ve 21,000 protein kodlayan gen içermektedir. Dahası, insan vücudu 200'den fazla özelleşmiş farklı hücre tipinden oluşur. Bu karmaşıklık, hücre ve moleküler biyoloji bakımından omurgalılarla çalışılmasını güçleştirir, ancak, her şeye rağmen, biyolojik bilimlerde ilginin çoğu insan organizmasını anlama arzusundan kaynaklanmaktadır. Üstelik, acil

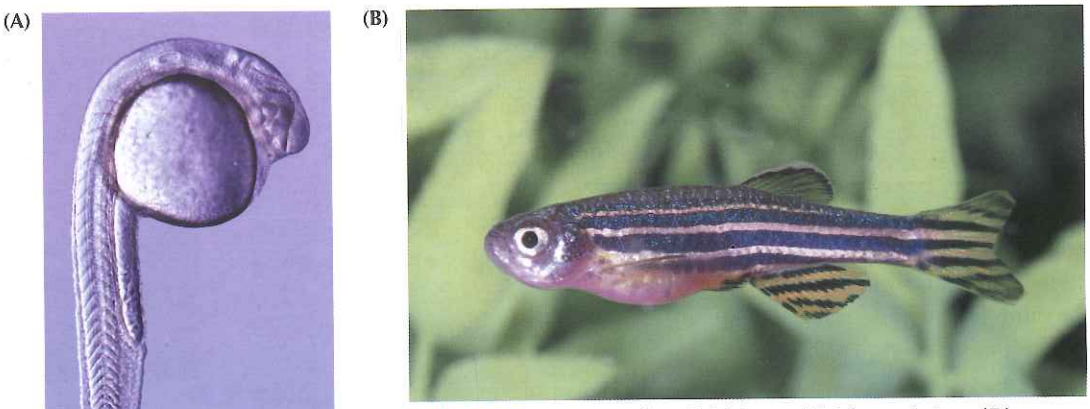
pratik öneme sahip bir çok sorunun yanıtının (örn., tıpta) direkt olarak insan (ya da çok yakın canlı) hücre tiplerinden elde edilmesi gerekmektedir.

İnsan ve diğer memeli hücrelerinin incelenmesine yönelik önemli bir yaklaşım, izole hücreleri, kontrollü laboratuvar koşullarında manipüle edilebilecekleri kültürlerde üretmektir. Kültür hücrelerinin kullanımı; DNA replikasyonu, gen ekspresyonu, protein sentezi ve işlenmesi ve hücre bölünmesi mekanizmalarını aydınlatmış olan deneyler gibi, memeli hücre biyolojisinin birçok yönünün araştırılmasına olanak sağlamıştır. Dahası, kimyasal olarak tanımlanmış bir ortamda hücrelerin kültüre edilebilmesi, organizmada hücre büyümesini ve farklılaşmasını kontrol eden sinyal iletim mekanizmalarının araştırılmasına olanak sağlamıştır.

Yüksek düzeyde farklılaşmış bazı hücre tiplerinin özgün nitelikleri, hücre biyolojisinin belirli alanlarının araştırılması için önemli birer örnek olmalarını sağlamıştır. Örneğin, kas hücreleri kasılmak, kuvvet ve hareket üretmek üzere oldukça özelleşmişlerdir. Bu özgünlükleri nedeniyle kas hücreleri, hareketin moleküler düzeyde incelenmesi için çok önemli bir modeldir. Diğer bir örnek, elektrokimyasal sinyalleri uzun mesafeler boyunca iletmek için özelleşmiş olan sinir hücreleridir (nöronlar). İnsanlarda, sinir hücresi aksonlarının uzunlukları bir metreden fazla olabilir ve mürekkepbalığı gibi bazı omurgasızlar, çapları 1 mm'ye varan aksonları olan dev nöronlara sahiptir. Yüksek oranda özelleşmiş yapılarından ve işlevlerinden dolayı, bu dev nöronlar, plazma zarından iyon taşınımı ve sitoplazmik organellerin taşınımında hücre iskeletinin rolü üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan önemli modellerdir.

Bir kurbağa türü olan ***Xenopus laevis***, omurgalı gelişiminin erken dönemlerinin çalışılması için önemli bir modeldir. *Xenopus* yumurtaları, 1 mm'ye varan çaplarıyla, olağanüstü büyüklükte hücrelerdir (**Şekil 1.19**). Bu yumurtalar anne vücudu dışında geliştiği için, yumurtadan iribaşa (*tadpole*) kadar tüm gelişim süreci laboratuvar ortamında kolaylıkla incelenebilir. Ayrıca, *Xenopus* yumurtalarının bol miktarda elde edilebilmesi biyokimyasal incelemeleri kolaylaştırır. Bu teknik avantajları nedeniyle, *Xenopus*, gelişimsel biyoloji araştırmalarında yaygın olarak kullanılmış, gelişim, farklılaşma

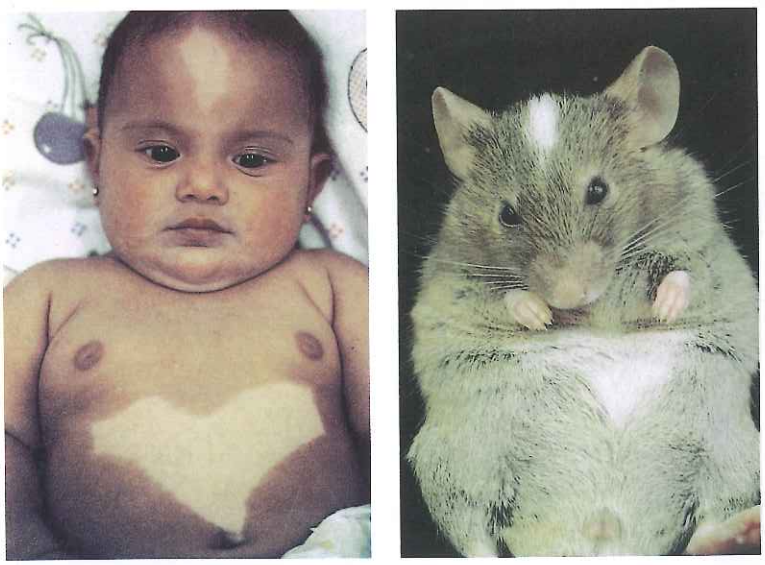
Şekil 1.19 Kurbağa *Xenopus laevis*'in yumurtaları Büyük *Xenopus* yumurtaları erken omurgalı gelişiminin çalışılmasında kullanışlıdır. (Michael Danilchik ve Kimberly Ray'in izni ile)



Şekil 1.20 Zebrabalığı (A) 24 saatlik bir embriyo. (B) Erişkin bir balık. (A, Charles Kimmel'ın izni ile Oregon Üniversitesi.)

ve embriyonik hücre bölünmesini kontrol eden moleküler mekanizmaların kavranmasını sağlamıştır.

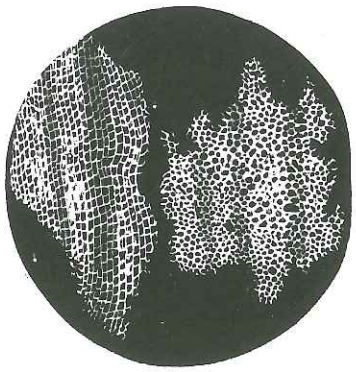
Zebrabalığı (Şekil 1.20), omurgalı gelişiminin genetik incelemeleri için bazı avantajlara sahiptir. Bu küçük balıkların laboratuvarda bakımı kolaydır ve 3-4 aylık üreme zamanları ile hızlı çoğalırlar. Buna ek olarak, embriyolar anne vücudunun dışında gelişirler ve şeffaftırlar, bu nedenle gelişimin erken evreleri kolayca gözlenebilir. Zebrabalığının gelişimini etkileyen mutasyonların izolasyonunu kolaylaştırmak için güçlü metotlar geliştirilmiştir ve şu anda bu tip mutasyonlardan birkaç bini tanımlanmıştır. Çalışılması kolay bir omurgalı olması nedeniyle zebrabalığı, insanlar ile *C. elegans* ve *Drosophila* gibi daha basit omurgasız sistemler arasındaki boşluğu kapatmayı vadetmektedir.



Şekil 1.21 İnsan gelişimi için model olarak fare Bir çocuk ve bir fare, embriyonik gelişim sürecinde melanositlerin (derinin renklenmesinden sorumlu hücreler) normal göçü için gerekli olan bir gendeki mutasyonların sonucu olarak, benzer pigmentasyon bozuklukları (piebaldism) gösterirler. (R. A. Fleichman'ın izni ile Kentucky Üniversitesi, Markey Kanser Merkezi)

Memeliler arasında, fare, genetik analizler için en uygun olan canlıdır. Fare genetiğinin araştırılmasındaki teknik zorlukları (örneğin, maya veya *Drosophila* genetiğiyle kıyaslandığında) göz korkutucu düzeyde olmasına rağmen, fare gelişimini etkileyen birçok mutasyon tanımlanmıştır. En önemlisi, moleküler biyolojideki son gelişmeler, özgül mutant genlerin fare germ hattında oluşturulması ve böylece bu genlerin gelişim üzerindeki etkilerinin veya diğer hücresel işlevlerin tüm hayvan bağlamında çalışılabildiği, transgenik farelerin üretimine olanak sağlamıştır. İnsan gelişimi için farenin uygun bir model olduğu, sadece insan ve fare genomlarının benzerliğiyle değil,

aynı zamanda homolog genlerdeki mutasyonların her iki türde de benzer gelişim bozukluklar ile sonuçlanmasıyla da gösterilmiştir; piebaldism (bir pigmentasyon defekti) çarpıcı bir örnek oluşturmaktadır (Şekil 1.21).



Şekil 1.22 Şişe mantarının hücresel yapısı Robert Hooke'un, ışık mikroskobu ile incelenen ince bir şişe mantarı kesidini gösteren çiziminin çoğaltılması. Hooke'un gözlemlediği "hücreler" aslında, yalnızca, çok önce ölmüş olan hücrelerin duvar kalıntılarıdır.

Hücre Biyolojisinin Araçları

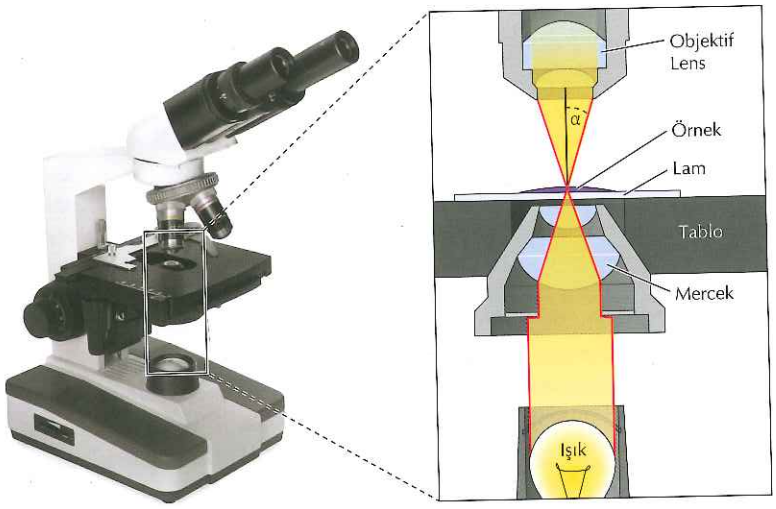
Tüm deneysel bilimlerde olduğu gibi, hücre biyolojisi araştırmaları, hücre yapısını ve işlevini incelemek için kullanılabilecek laboratuvar yöntemlerine bağımlıdır. Hücreleri anlamaya yönelik bir çok önemli gelişme, direkt olarak, yeni araştırma kulvarı açan modern yöntemlerin gelişimini izlemiştir. Hücre biyologlarının ellerindeki deney araçlarının değerlendirilmesi, bu çok hızlı gelişen bilim alanının hem güncel konumunun hem de gelecek hedeflerinin anlaşılması açısından önemlidir. Bazı önemli genel hücre biyolojisi yöntemleri, izleyen bölümlerde tanıtılmıştır. Moleküler biyoloji, genomik ve protemik metodlarını içeren diğer deneysel yaklaşımlar daha sonraki bölümlerde tartışılacaktır.

Işık mikroskopisi

Hücrelerin çoğu çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük olduklarından, hücre çalışmaları ağırlıklı olarak mikroskop kullanımı gerektirir. Gerçekten, hücrelerin keşfi mikroskobun geliştirilmesinden doğmuştur: Robert Hook 1665'de basit bir ışık mikroskobu ile, bir şişe mantarı parçasını gözlemleyerek "hücre" sözcüğünü ilk kez kullanmıştır (Şekil 1.22). Antony van Leeuwenhoek 1670'lerde, objeleri gerçek boyutlarının 300 katı kadar büyüten mikroskop kullanarak; sperm, kırmızı kan hücresi ve bakteriler gibi farklı türde çeşitli hücreleri gözleyebildi. Hücre teorisinin 1838'de Matthias Schleiden ve Theodor Schwann tarafından ortaya atılması, çağdaş hücre biyolojisinin doğuşu olarak kabul edilebilir. Schleiden tarafından bitki dokularının ve Schwann tarafından hayvan dokularının mikroskobik gözlemleri aynı sonuca ulaşmıştır: Tüm canlılar hücrelerden oluşur. Bu gelişmelerin hemen ardından, hücrelerin *de novo* oluşmadıkları, ancak daha önceden var olan hücrelerin bölünmesiyle ortaya çıktıkları anlaşıldı. Böylece, gözlemler ışık mikroskobuyla yapıldığı için, hücre, bütün canlı organizmaların temel birimi şeklindeki yaygın tanımını elde etti.

Hücre yapısının gittikçe daha ayrıntılı olarak görüntülenmesine olanak veren teknik gelişmelerle birlikte, ışık mikroskobu hala biyologların temel araçlarından biri olarak kalmıştır. Günümüz ışık mikroskopları objeleri yaklaşık bin kata kadar büyütme kapasitesine sahiptir. Çoğu 1 ile 100 μm çapında olan hücreler ışık mikroskobu ile gözlenebildiği gibi, nükleus, kloroplastlar ve mitokondriler gibi büyükçe hücre içi organeller de izlenebilir. Bununla birlikte, ışık mikroskopları hücre yapısının çok ince ayrıntılarını göstermek için yeterince güçlü değildir, bunun için **çözünürlük** – bir mikroskobun küçük mesafelerle ayrılmış objeleri ayırt etme kapasitesi – büyütmeden bile daha önemlidir. Görüntüler istenildiği kadar büyütülebilir (örneğin, büyük bir perdeye yansıtılarak), ancak, bu şekilde büyütme, gözlenebilen detay düzeyini artırmaz.

Işığın kırılması, ışık mikroskobunun çözünürlüğünü yaklaşık 2μm ile sınırlandırmaktadır; birbirine bu mesafeden daha yakın olan iki cisim birbirinden ayırt edilemez, tek bir cisim gibi görünür. Işık mikroskopisinin bu kuramsal sınırlılığını, aşağıdaki eşitlikte görülen iki faktör belirler –görünen ışığın dalga boyu (λ) ve mikroskop merceğinin ışık toplama gücü (nümerik açıklık, *NA*)– aşağıdaki denkleme göre:



Şekil 1.23 Nümerik açıklık Işık, toplayıcı mercekle örnek üzerine odaklanır ve daha sonra mikroskobun objektif merceğiyle toplanır. Nümerik açıklık, objektif merceğine gelen ışık konisinin açısıyla (α) ve mercekle örnek arasındaki ortamın (genellikle hava veya yağ) kırma indeksiyle belirlenir.

$$\text{Rezolüsyon} = \frac{0.61\lambda}{NA}$$

Görünen ışığın dalga boyu 0.4 ile 0.7 μm dir, bu nedenle λ'nın değeri, ışık mikroskobu için yaklaşık olarakk 0.5 μm civarında sabittir. Nümerik açıklık, örnekten geçtikten sonra, mikroskop merceğine giren ışık konisinin büyüklüğü olarak düşünülebilir (Şekil 1.23). Işığın, örnek ile mercek arasında yol aldığı ortamın kırma indeksi η olarak alındığında;

$$NA = \eta \sin \alpha$$

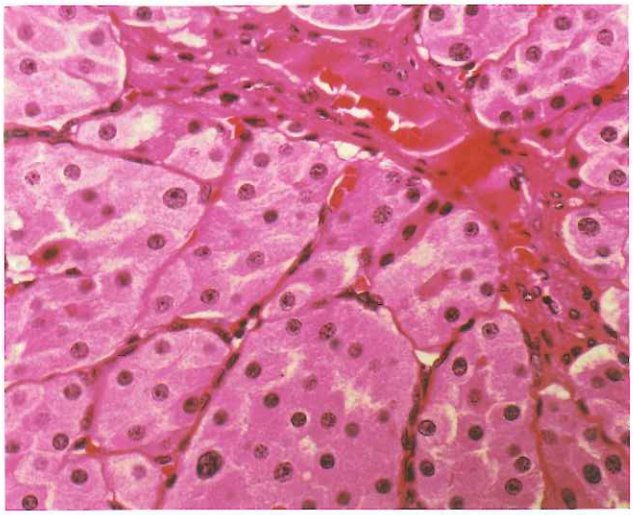
eşitliğiyle belirtilir. Hava için η değeri 1.0'dır, fakat, örneği bir damla yağ üzerinden incelemek için yağ-immersiyon lensi kullanılarak bu değer yaklaşık 1.4 ile maksimuma çıkarılabilir. Alfa açısı, lens tarafından toplanan ışık konisinin genişliğinin yarısına denktir. Maksimum α değeri 90°'dir, bu durumda sin $\alpha = 1$ ve nümerik açıklığın en yüksek olası değeri ise 1.4'dür.

Işık mikroskobunun kuramsal rezolüsyon sınırı, aşağıdaki şekilde hesaplanabilir:

$$\text{Rezolüsyon} = \frac{0.61 \times 0.5}{1.4} = 0.22\ \mu\text{m}$$

Bu rezolüsyon düzeyine ulaşabilen mikroskoplar, 19. yüzyılın sonlarında yapılmıştı; ışık mikroskoplarında çözünürlüğün teorik sınırlarına ulaşılmıştır. Ancak, aşağıda tartışıldığı gibi, yeni yaklaşımlar yeni metodların gelişmesine yol açarak (süper çözünürlüklü mikroskopi) floresan mikroskopisinde, çözünürlük gücünde, bu limitin ötesinde büyük artış sağlanmıştır.

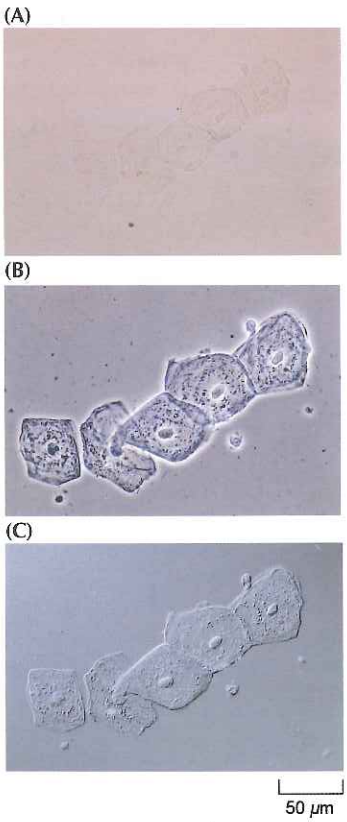
Hücre yapısının çeşitli yönleriyle incelenmesinde, birkaç farklı tip ışık mikroskobu rutin olarak kullanılır. En basiti, ışığın direkt



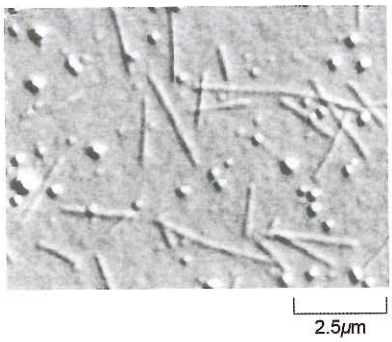
Şekil 1.24 Boyalı dokunun aydınlık-alan mikroskop görüntüsü Benign böbrek tümöründen bir kesit.

olarak hücreden geçtiği ve hücrenin farklı bölgelerini ayırt edebilme kapasitesinin, görünen ışığın hücre bileşenleri tarafından soğurulmasından kaynaklanan kontrasta bağlı olduğu, **aydınlık alan mikroskopisidir.** Çoğu zaman, hücreler, hücrelerin farklı bölgelerini ayırt edebilmek için kontrast farklılıkları oluşturmak üzere proteinlerle ya da nükleik asitlerle tepkime veren boyalarla boyanırlar. Boyama öncesinde, örnekler, yapılarının sağlamlaştırılması ve korunması için genellikle sabitleyicilerle (alkol, asetik asit veya formaldehit gibi) muamele edilirler. Sabitlenmiş ve boyanmış dokuların aydınlık-alan mikroskopisi ile incelenmesi, histoloji laboratuvarlarında doku analizi için standart bir yaklaşımdır (Şekil 1.24). Bu tarz boyama işlemleri hücreleri öldürdüğünden, canlı hücre gözlenmesini gerektiren birçok araştırma için uygun değildir.

Boyama yapılmadığı zaman, ışığın doğrudan dokudan geçmesi hücrenin çoğu bölümlerini ayırt edebilecek kontrastı sağlamaz ve bu durum, aydınlık-alan mikroskopisinin kullanılabilirliğini sınırlar. Yine de, hücrenin farklı yoğunluklu bölgelerini geçen ışık dalgaları arasındaki kontrastı arttıran, farklı optik düzenekli ışık mikroskopları kullanılabilir. Canlı hücreleri görüntülemek için çok yaygın iki yöntem, **faz-kontrast mikroskopisi** ve **diferansiyel interferens-kontrast mikroskopisidir** (Şekil 1.25). Her iki mikroskopide de, hücrenin farklı bölgeleri arasındaki yoğunluk veya kalınlık farklılıklarını, sonuçtaki görüntüde kontrast farklılıklarına dönüştüren optik sistemler kullanılır. Aydınlık-alan mikroskopisinde, saydam yapılar (nukleus gibi) ışığı çok az soğurduklarından, düşük kontrast verirler. Ancak, ışık bu yapılardan geçerken yavaşlar ve çevresindeki sitoplazmadan geçen ışığa kıyasla faz değişikliği olur. Faz-kontrast ve diferansiyel interferens-kontrast mikroskopları, bu faz farklılaşmalarını kontrast farklılaşmalarına çevirerek, canlı, boyanmamış hücrelerin daha gelişmiş görüntülerinin elde edilmesini sağlar.



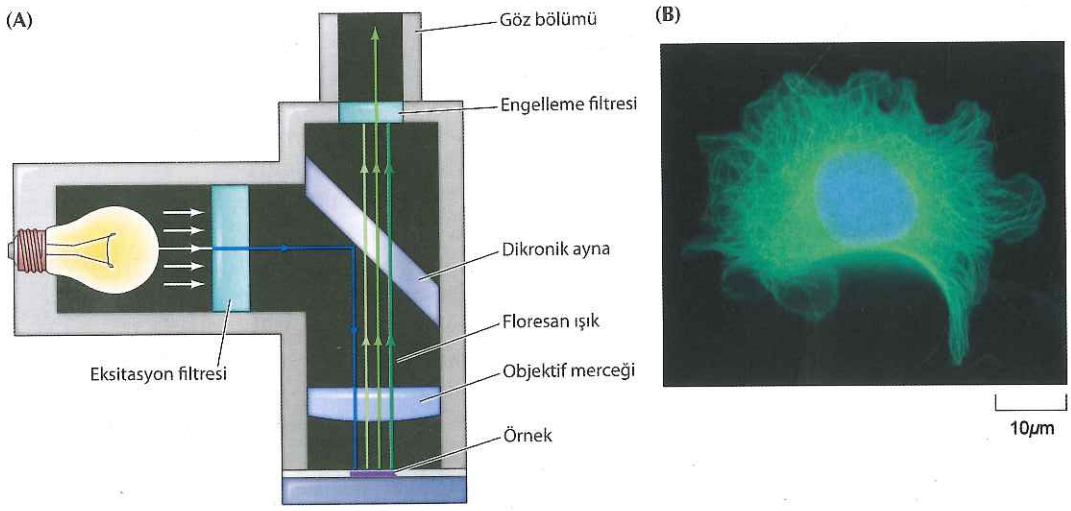
Şekil 1.25 Canlı hücrelerin mikroskopik gözlemi İnsan yanak hücrelerinin (A) aydınlık-alan, (B) faz-kontrast ve (C) diferansiyel İnterferens – kontrast mikroskopisi ile elde edilen görüntüleri. (Mort Abramowitz'in izni ile, Olympus America, Inc.)



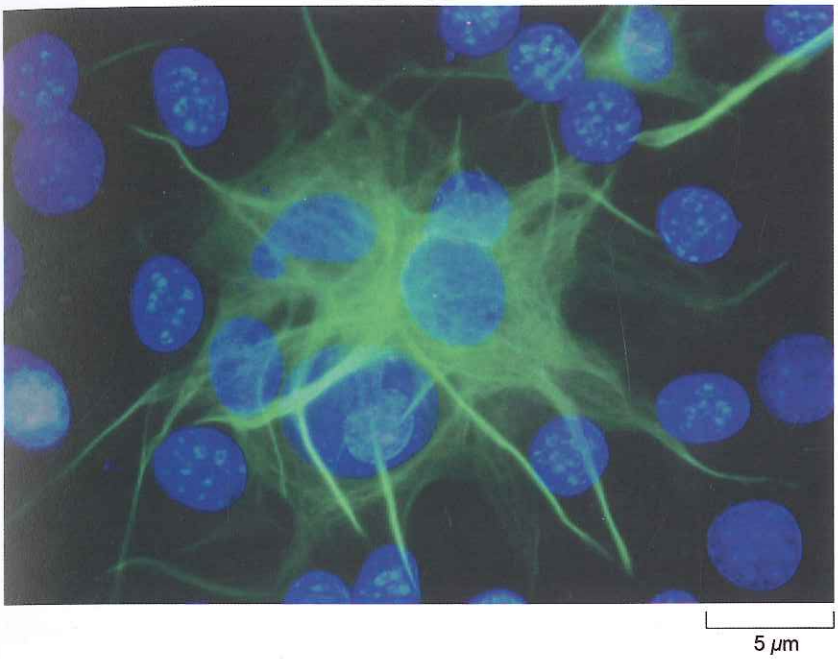
Şekil 1.26 Video ile güçlendirilmiş diferansiyel interferens- kontrast mikroskobu Elektronik görüntü işleme, mikrotübüllerin tek tek görülmesini sağlar. (E. D. Salmon'un izni ile, North Carolina Üniversitesi, Chapel Hill.)

Işık mikroskobunun gücü, video kameralar ve görüntü analizi ve işlenmesi için bilgisayarların kullanılması ile önemli ölçüde artırılmıştır. Bu gibi elektronik görüntü-işleme sistemleri, ışık mikroskobu ile elde edilen görüntülerin kontrastlığını artırarak, başka türlü saptanamayacak olan küçük objelerin görülebilmesine olanak sağlar. Örneğin; video ile güçlendirilmiş diferansiyel interferens-kontrast mikroskobu, organellerin, yalnızca 0.025 μm çapında bir hücre iskeleti proteini olan mikrotübüller boyunca hareketlerinin görüntülenmesine olanak sağlamıştır (**Şekil 1.26**). Ancak, bu güç artışı, ışık mikroskobunun yaklaşık 0.2 μm olan teorik rezolüsyon sınırının üstesinden gelemez. Bu nedenle, video ile güçlendirme, her ne kadar, mikrotübüllerin görülebilmesini sağlamışsa da, mikrotübüller 0.2 μm çapında ve bulanık olarak görünür ve tek bir mikrotübül, yakınındaki yapılar arasında ayırt edilemez.

Belirli molekülleri hücre içinde görüntüleme amaçlı işaretleme yöntemleri sayesinde, ışık mikroskopisi moleküler analiz düzeyine ulaştırılmıştır. Spesifik genler veya RNA transkriptleri, komplementer dizili nükleik asit probları ile hibridizasyon yoluyla, proteinler de uygun antikorlar kullanılarak saptanabilir (bkz. Bölüm 4). Nükleik asit problar ve antikorlar, ışık mikroskobuyla görüntülenebilmeleri ve molekülün hücrenin içerisindeki yerinin belirlenebilmesi için çeşitli takılarla işaretlenebilirler.



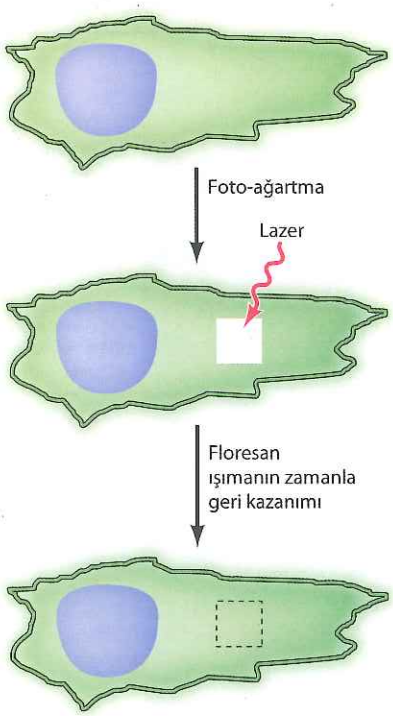
Şekil 1.27 Floresan mikroskopi (A) Işık bir eksitasyon filtresinden geçirilerek, floresan boyayı eskite eden dalga boyundaki ışık (örn., mavi) seçilir. Dikronik bir ayna eksitasyon ışığını incelenecek örneğin üzerine yansıtır. Örneğin yaydığı floresan ışık (örn., yeşil) dikronik aynadan ve boyanın yaydığı dalga boyundaki ışığı seçecek olan ikinci filtreden (engel filtresi) geçer. (B) DNA'sı mavi, sitoplazmadaki mikrotübülleri yeşil boyanmış bir kertenkele akciğer hücresinin floresan mikroskop görüntüsü.



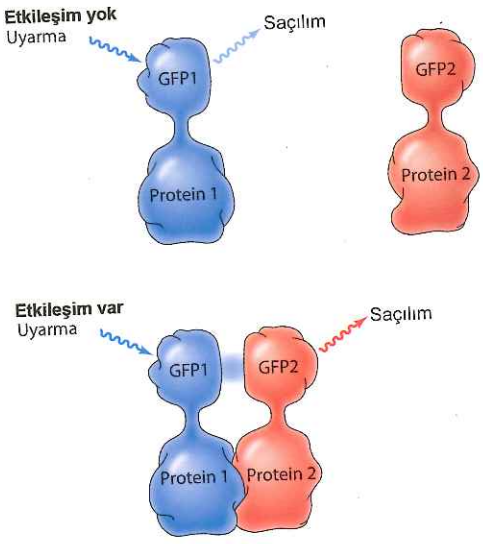
Şekil 1.28 GFP ile işaretlenmiş bir proteinin floresan mikroskopisi GFP ile füzyon oluşturmuş bir mikrotübül ilişkili protein fare nöron kültüründeki hücrelere aktarılarak floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir. Çekirdek mavi boyanmıştır. (A. Cariboni, 2004. *Nature Cell Biol.* 6:929.)

Floresans mikroskopisi, moleküllerin hücre içerisindeki dağılımını incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.27). Canlı veya fikse edilmiş hücrelerin içindeki ilgilenilen molekülü işaretlemek için bir floresan boya kullanılır. Floresan boya, ışığı, bir dalga boyundan absorblayıp, ikinci bir dalga boyunda gönderen bir moleküldür. Bu floresan, incelenecek örneği, floresan boyayı uyaran bir dalga boyundaki ışıkla uyarılıp, boyanın gönderdiği özgün ışığın dalga boyunu yakalayabilen filtreler kullanılarak saptanır. Floresan mikroskopisi hücreler içerisinde çeşitli moleküllerin araştırılması amacıyla kullanılabilir. Sık uygulamalardan biri, özgül bir proteini hedefleyen antikorları floresan boyalarla işaretleyerek, proteinin hücre içi dağılımının saptanabilmesidir.

Floresans mikroskopisinde önemli bir gelişme, denizanası **yeşil floresan proteininin (GFP)** canlı hücrelerin içindeki proteinleri görüntülemek için kullanılmasıdır. GFP, standard rekombinant DNA yöntemleri kullanılarak ilgi duyulan herhangi bir proteinle birleştirilebilir ve GFP-eklentili protein hücrede eksprese ettirilerek, proteinlerin antikorla belirlenmesinde gerektiği gibi hücreleri sabitleyip boyamaya gerek olmadan, floresan mikroskopisi ile görüntülenebilir. Çok yönlü kullanılabilirliği nedeniyle, hücre biyolojisinde GFP kullanımı son derece yaygınlaşmıştır ve geniş çeşitlilikteki proteinlerin canlı hücreler içerisindeki yerleşimlerinin çalışılması amacıyla kullanılmaktadır (Şekil 1.28). Birbiriyle ilişkili mavi, sarı veya kırmızı emisyona sahip çeşitli floresan proteinler, farklı proteinlerin eş zamanlı olarak görüntülenmesini mümkün kılarak bu tekniğin daha geniş kapsamlı kullanımına imkan vermektedir.



Şekil 1.29 Foto-ağartma sonrası floresan geri kazanım (*Fluorescence Recovery After Photobleaching: FRAP*) Hücrenin GFP-etiketli proteini eksprese eden bir bölgesi lazer ile ağartılır. Ağartılmamış GFP-etiketli moleküller ağartılmış bölgeye nüfuz ettiğinde floresan ışıma zamanla geri kazanılır. Floresan ışımanın geri kazanım hızı böylelikle protein hücre içinde hareket hızının bir ölçümünü sağlar.



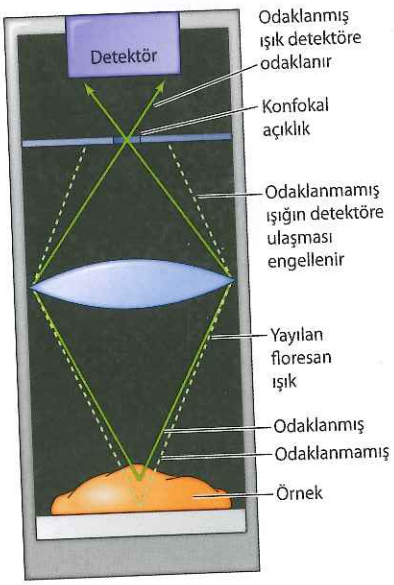
Şekil 1.30 Floresan rezonans enerji transferi (FRET) İki proteinin farklı dalga boylarında eksitasyon ve emisyon yapan GFP varyantları (GFP1 ve GFP2) ile füzyonu oluşturulur. Öyle ki, GFP1 tarafından yayılan ışık GFP2'yi uyarır. Hücreler GFP1'i uyarma özelliğindeki dalga boyuna sahip bir ışığa maruz bırakılır. Eğer proteinler etkileşim içinde değil ise GFP1 tarafından saçılmış bir ışık tespit edilecek. Ancak, eğer proteinler etkileşim içinde ise, GFP1'den yayılan ışık GFP2'yi uyaracak ve GFP2 tarafından yayılan ışık tespit edilecektir.

Canlı hücreler içindeki GFP-etiketli proteinlerin hareketlerini ve etkileşimlerini takip etmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. **Foto-ağartma sonrası floresan ışımanın geri kazanımı (*Fluorescence Recovery After Photobleaching: FRAP*)**, GFP-etiketli proteinlerin hareketlerinin çalışılmasında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir (Şekil 1.29). Bu teknikte, hücrenin GFP-etiketli protein eksprese edilen ilgilenilen bir bölgesi, yüksek yoğunluklu ışığa maruz bırakılarak ağartılır. Ağırtılmış bölgeye, ağırtılmamış GFP-etiketli proteinlerin zaman içindeki göçü ile floresan ışımanın geri kazanılması, hücre içinde ilgili bölgeye protein göç hızının belirlenmesine olanak sağlar.

Bir hücre içindeki iki proteinin bir biri ile etkileşimleri **floresan rezonans enerji transferi (*Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET*)** adı verilen bir teknik ile analiz edilebilir (Şekil 1.30). FRET deneylerinde, ilgilenilen iki protein, GFP'nin iki farklı varyantı gibi farklı floresan boyalarla etiketlenir. GFP varyantları farklı dalga boylarındaki ışıkları absorbe etmek ve yaymak üzere seçilirler ve böylece bir GFP varyantı tarafından yayılan ışık ikincisini uyarır. İki protein arasındaki etkileşim, birinci GFP varyantını uyaran bir dalga boyundaki ışık ile hücrenin aydınlatması sonrasında hücreden yayılan ışığın dalga boyunun analiz edilmesi ile tespit edilebilir. Eğer GFP varyantları ile etiketlenen proteinler hücre içinde etkileşim halindelerse, floresan molekülleri birbirine yakın hale gelirler ve birinci GFP varyantından saçılan ışık ikinci GFP varyantının uyarılmasını sağlayarak, sonuçta ikinci GFP varyantına özgü dalga boyundaki ışık emisyonu gerçekleşir.

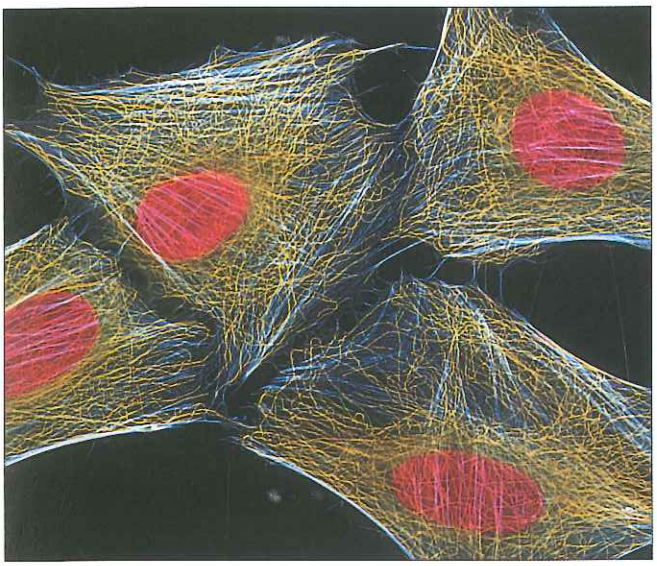
Bilgi İçin

Yarı-iletken nanokristaller (kuantum noktaları diye adlandırılır) birçok floresan mikroskobu uygulamasında giderek artan bir şekilde floresan boyaların yerine kullanılmaktadır. Kuantum noktaları geleneksel floresan boyalardan daha parlak floresan ışık yayar ve daha stabildir.



Geleneksel floresan mikroskobu ile elde edilen görüntüler, odak-dışı floresan ışımalar sebebiyle bulanıklaşır. Bu görüntüler, görüntü dekonvolüsyon adı verilen bir bilgisayar yaklaşımı ile geliştirilebilmektedir. Bu sistemde, farklı odak derinliklerinden elde edilen görüntüler bir bilgisayarda analiz edilir ve tek bir odak noktasından beklenenden daha net bir görüntü oluşturulur. Buna alternatif olarak, **konfokal mikroskopisi**, örnekteki tek bir noktadan elde edilen filoresanı analiz ederek yüksek kontrastlı ve detaylı görüntülere imkan verir. Genellikle bir lazer ile sağlanan küçük bir ışık noktası, incelenecek örnek üzerinde, belirli derinlikte odaklanır. Yayılan floresan ışık, video kamera gibi bir detektör vasıtasıyla toplanır. Ancak, yayılan ışık detektöre ulaşmadan

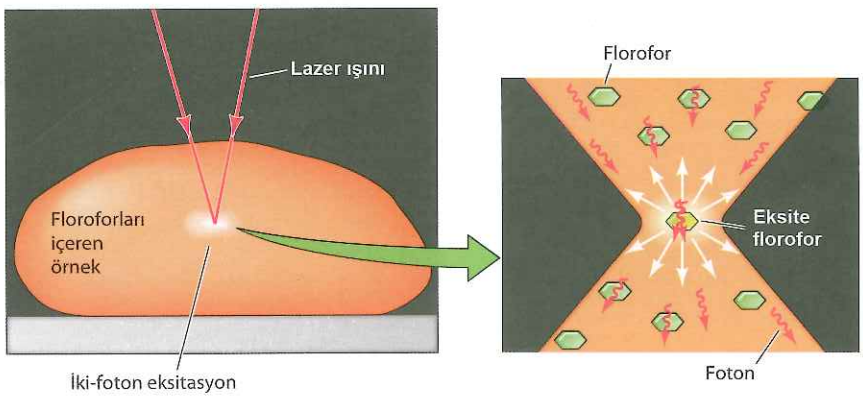
Şekil 1.31 Konfokal mikroskopi İğne ucu genişliğinde bir ışık örnek üzerine belirli bir derinliğe odaklanır ve geri gelen floresan ışık bir detektörle toplanır. Örnekten yayılan ışık detektöre ulaşmadan önce, örneğin seçilen derinliğinden gelen ışığın odaklandığı noktaya yerleştirilen bir konfokal açıklıktan geçmesi gerekir. Sonuç olarak, sadece, örnekte seçilen derinlikten yayılan odaklanmış ışık saptanabilir.



Şekil 1.32 İnsan hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü Mikrotübüller sarı floresan boya ile boyandı, aktin flamalar mavi ve çekirdekler kırmızı ile boyandı.

önce, tam olarak, örneğin seçilen derinliğinden gelen ışığın odaklandığı noktaya yerleştirilen bir iğne deliği açıklığından (bir konfokal açıklığı olarak adlandırılır) geçmesi gerekir (**Şekil 1.31**). Sonuç olarak, sadece odaklanılan düzlemden gönderilen ışık detektöre ulaşabilir. İncelenen örneğin baştan sona taranması ile, odaklanan düzlemin, standard floresan mikroskopisi ile elde edilenden çok daha keskin bir iki boyutlu görüntüsü elde edilir (**Şekil 1.32**). Bunun da ötesinde, örneğin üç-boyutlu bir görüntüsünü kurgulamak için, farklı derinliklerden elde edilen bir dizi görüntüden yararlanılabilir.

Multi-foton eksitasyon (uyarı) mikroskopisi, canlı hücrelerin incelenmesinde konfokal mikroskopiye alternatiftir. İncelenecek örnek, tek bir dalga boyundaki ışık ile aydınlatılır, öyle ki, floresan boyanın eksitasyonu için eşzamanlı olarak iki veya daha fazla fotunun absorbansına ihtiyaç duyulmaktadır. (**Şekil 1.33**). İki fotonun aynı anda floresan boyayı uyarma olasılığı, sadece, örneğin içerisine giren lazer ışınının odaklandığı noktada anlamlıdır, böylece floresan yalnızca giren ışığın odaklanmış olduğu



Şekil 1.33 İki-foton eksitasyon mikroskopisi Floresan boyayı uyarmak için iki fotonun eşzamanlı absorbsiyonu gerekir. Bu sadece, gelen ışığın örnek içerisinde odaklandığı noktada meydana gelir, böylece, floresan ışık sadece örneğin belirlenen derinliğinden yayılır.

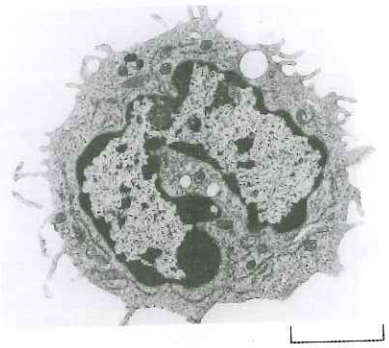
düzlemden yayılır. Bu çok iyi sınırlanan eksitasyon sayesinde, yayılan ışığın konfokal mikroskopisindeki gibi bir iğne deliği açıklığından geçirilmesine gerek kalmaz. Ayrıca, uyarının lokalizasyonu örneğe verilecek hasarı en aza indirerek canlı hücrenin üç boyutlu görüntüsünün elde edilmesine imkan verir.

Elektron mikroskopisi

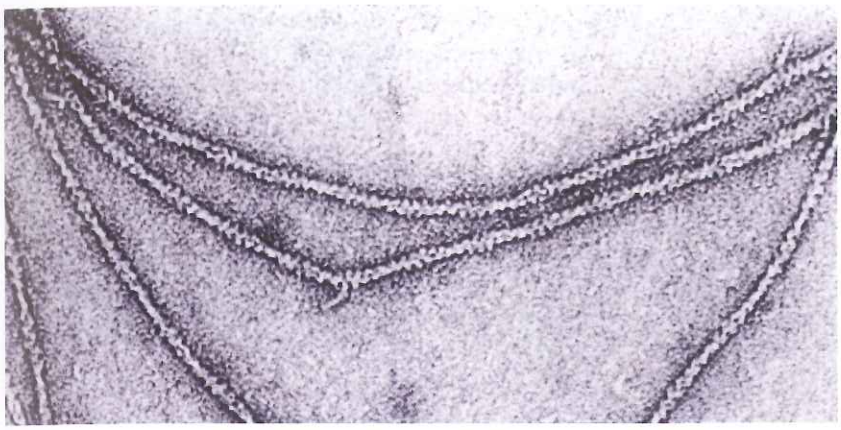
Işık mikroskobunun çözünürlüğünün sınırlı oluşu, hücre yapısının daha ayrıntılı analizi için, 1930'larda geliştirilen ve biyolojik örnekler üzerinde ilk kez Albert Claude, Keith Porter ve George Palade tarafından 1940'larda ve 1950'lerde kullanılan elektron mikroskobu gibi, daha güçlü mikroskobik yöntemlerin kullanımını gerektirmiştir. Elektronların dalga boyu ışığınkinden daha kısa olduğu için, elektron mikroskobu ışık mikroskobuna göre çok daha yüksek çözünürlüğe ulaşabilmektedir. Bir elektron mikroskobunda elektronların dalga boyu 0.004 nm kadar kısa olabilir, ki bu, görünen ışığın dalga boyundan yaklaşık 100,000 kez daha kısadır. Teorik olarak bu dalga boyunun 0.002 nm çözünürlük sağlaması gerekir, ancak, çözünürlük sadece dalga boyuyla değil aynı zamanda mikroskop merceğinin nümerik açıklığıyla da belirlendiğinden, pratikte bu çözünürlük elde edilemez. Elektromanyetik merceklerin doğası, açıklık açılarını yaklaşık 0.5 derece ile sınırladığı ve bu da sadece 0.01 kadar bir nümerik açıklığa denk geldiği için, elektron mikroskopisinde nümerik açıklık sınırlayıcı faktördür. Böylece, optimum koşullarda, elektron mikroskobunun çözme gücü 0.2 nm kadardır. Bunun da ötesinde, biyolojik örneklerle elde edilebilen çözünürlük, doğal kontrast eksiklikleri nedeniyle daha da sınırlıdır. Sonuç olarak, biyolojik örnekler için elektron mikroskobunun pratikteki limiti 1-2 nm'dir. Her ne kadar bu çözünürlük elektronların dalga boyuna göre hesaplanandan çok daha az ise de, ışık mikroskoplarının çözücü gücünün yüz misli üzerinde bir ilerlemeyi simgeler.

Elektron mikroskopisinin iki tipi –transmisyon ve tarama elektron mikroskopisi– hücreleri incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Prensip olarak, **transmisyon elektron mikroskopisi,** boyanmış hücrelerin aydınlık-alan mikroskobu ile gözlenmesine benzer. Örnekler sabitlenip, saçılan elektronlar ile kontrast veren ağır metal tuzları ile boyanır. Daha sonra, bir elektron demeti örnekten geçirilip, floresan bir ekran üzerinde görüntü oluşturmak üzere odaklanır. Örnekten geçerken ağır metal iyonu ile karşılaşan elektronlar sapar ve son görüntüde payları olmaz ve böylece örneğin boyanan bölümleri karanlık görünür.

Transmisyon elektron mikroskobu ile incelenmek istenen örnekler negatif veya pozitif boyama ile hazırlanabilir. Pozitif boyamada, doku örnekleri ince kesitler halinde kesilir, lipidler, proteinler ve nükleik asit ile reaksiyona girebilen ağır metal tuzları (osmium tetroksit, uranil asetat ve kurşun sitrat gibi) ile boyanır. Bu ağır metal iyonları, son görüntüde karanlık gözükecek olan çeşitli hücre yapılarına bağlanırlar (**Şekil 1.34**). Alternatif pozitif boyama yöntemleri de hücrelerdeki belirli makro molekülleri saptamak amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin, elektron- yoğunluklu ağır metallerle (altın parçacıkları gibi) işaretlenmiş antikorlar, elektron mikroskobunda spesifik proteinlerin hücre içi yerleşimlerini belirlemek amacı ile kullanılmaktadır. Bu yöntem, floresan mikroskopisinde, floresan boyalar ile işaretlenmiş antikorların kullanımına



Şekil 1.34 Pozitif boyama Ağır metal tuzları ile pozitif boyanmış beyaz kan hücrelerinin transmisyon elektron mikroskop görüntüsü.

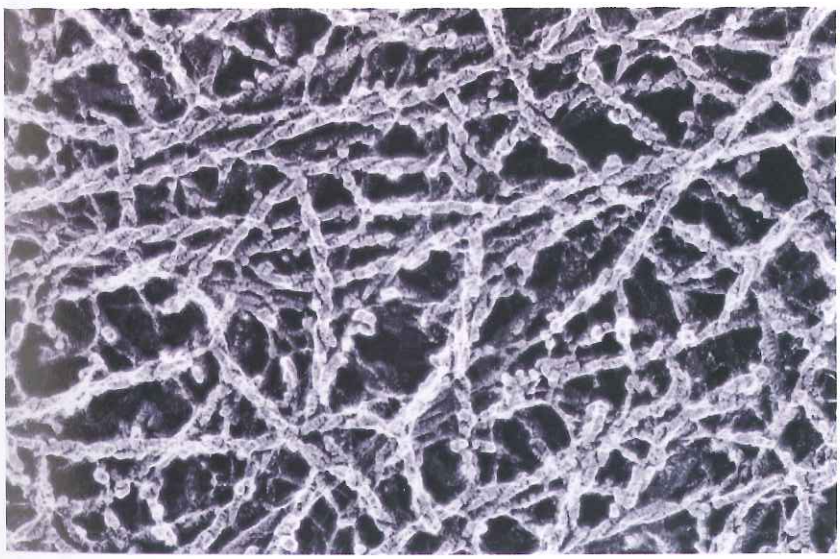


Şekil 1.35 Negatif boyama Negatif boyanmış aktin flamanlarının transmisyon elektron mikroskop görüntüsü. (Roger Craig'in izni ile, Massachustts Üniversitesi Tıp Merkezi)

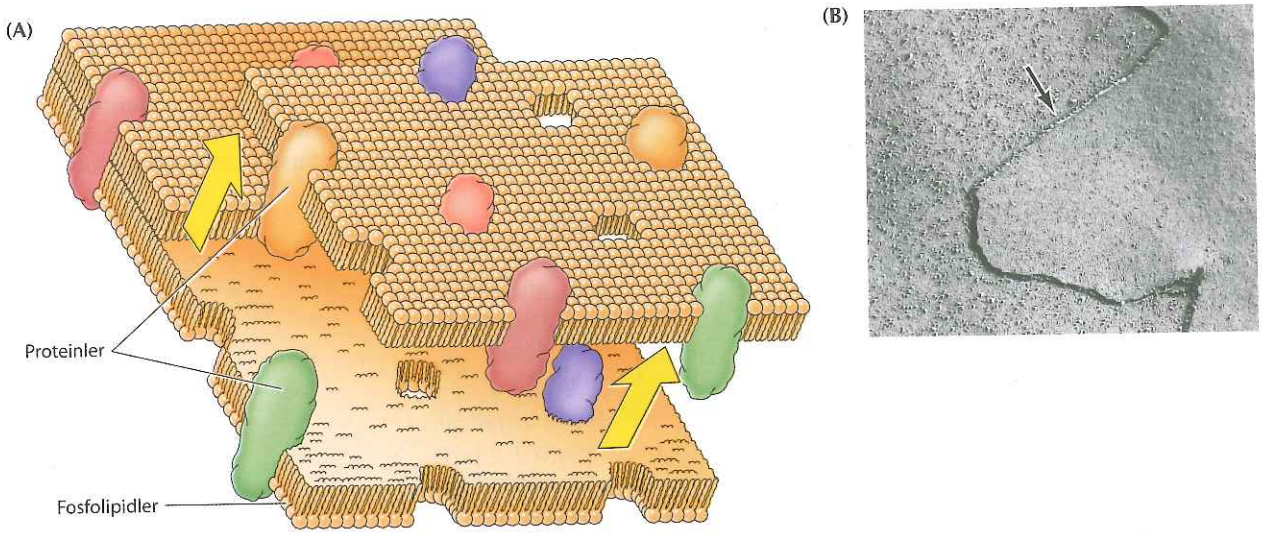
benzemektedir. Yapıların 2-10 nm çözünürlükteki üç boyutlu görüntüleri **elektron tomografi** metodu kullanılarak da elde edilebilmektedir. Bu üç boyutlu görüntü, görüntüleme yönünün üzerindeki sınırlardan alınan çok sayıdaki iki boyutlu görüntünün bilgisayar analizi ile oluşturulmaktadır.

Negatif boyama; bakteriler, izole edilmiş hücre içi organeller ve makro moleküller gibi bütün halindeki biyolojik yapıların görüntülenmesi için kullanılır (Şekil 1.35). Bu yöntemde, biyolojik örnek destekleyici bir ince tabaka üzerine konur ve bir ağır metal boyanın, bu örneğin yüzeyi etrafında kuruması sağlanır. Boyanmamış örneğin çevresi, elektron yoğunluklu bir boya tabakası ile kaplanır ve bu sayede karanlık arka plan üzerinde örnek aydınlık görünür.

Metal gölgeleme yöntemi, izole edilmiş hücre içi yapıların veya makro moleküllerin yüzeylerinin transmisyon elektron mikroskobunda görüntülenmesinde kullanılan diğer bir tekniktir (Şekil 1.36). Örnek, platin gibi, buharlaştırılan ince bir metal katmanı ile kaplanır. Metal, buharlaştırılan metal



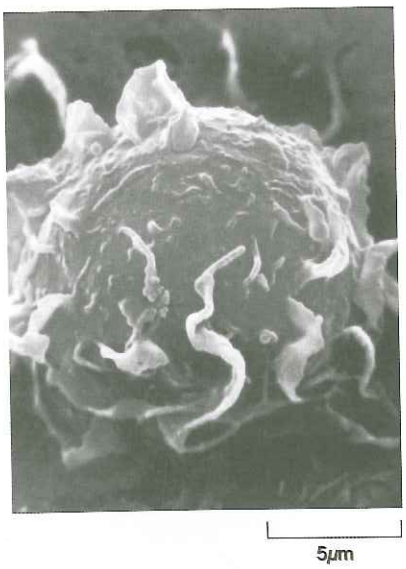
Şekil 1.36 Metal gölgeleme Metal gölgeleme ile hazırlanan hücre iskeleti aktin/miyozin flamanlarının elektron mikroskop görüntüsü.



Şekil 1.37 Dondurup-çatlatma (A) Dondurup-çatlatma lipid çift tabakasını ikiye ayırır, zara gömülü olan proteinler iki tabakadan birine bağlı kalır. (B) Bitişik iki hücrenin dondurulup-çatlatılmış plazma zarlarının mikroskop görüntüsü. Çift tabakayı kat eden proteinler zar içi partiküller olarak görülür (ok).

moleküllerinin kaynağına bakan örnek yüzeyinin diğer taraflardan daha yoğun metal kaplanacağı bir açıdan örnek üzerine püskürtülür. Bu farklı kaplama bir gölge etkisi yaratır, böylece örneğin elektron mikroskop görüntüleri üç boyutlu gözükür.

Örneklerin, metal gölgelemesi ile kombine olarak **dondurup-çatlatma** (***freeze fracture***) yöntemi ile hazırlanması özellikle zar yapılarının araştırılmasında önem kazanmıştır. Örnekler sıvı azot içerisinde (-196°C) dondurulur ve daha sonra bir bıçak ağzıyla çatlatılır. Bu işlem genellikle, hücre zarının iç yüzeyini açığa çıkaracak şekilde, lipid çift tabakayı ikiye ayırır (Şekil 1.37). Daha sonra örnek platin ile gölgelenir, biyolojik materyal asit ile çözülerek, örnek yüzeyinin metal kalıbı elde edilir. Bu kalıplar elektron mikroskobunda incelendiğinde, lipid çift tabakayı kat eden proteinlere uyan birçok yüzey çıkıntısı görülür. Dondurup-çatlatma yönteminin, dondurup-şekil çıkartma olarak isimlendirilen değişik bir tipi, hücre zarlarının iç yüzlerine ek olarak dış yüzeylerinin de görüntülenmesini sağlar.



Şekil 1.38 Tarama elektron mikroskopisi Bir makrofaja ait tarama elektron mikroskop görüntüsü. Elektron yayılımı örneğin yüzeyini tarar, içerisinden geçmez.

Elektron mikroskopisinin ikinci çeşidi olan **tarama elektron mikroskopisi**, hücrelerin üç boyutlu görüntülerinin elde edilmesi amacıyla kullanılır (Şekil 1.38). Tarama elektron mikroskopisinde elektron demeti, örneğin içinden geçmez. Bunun yerine, hücrenin yüzeyi ağır bir metal ile kaplanır ve bir elektron demeti kullanılarak, örnek baştan başa taranır. Elektron demeti hücre boyunca hareket ederken, örnek yüzeyinden geri gelen ya da saçılan elektronlar, üç boyutlu görüntü oluşturmak üzere toplanır.

Süper çözünürlüklü ışık mikroskopisi

Elektron mikroskopisi, ışık mikroskopisinden daha yüksek çözünürlük sunmasına rağmen çeşitli dezavantajları vardır. Elektron mikroskopisi pahalı ve kullanımı teknik olarak zordur. Elektron mikroskopisinde ihtiyaç duyulan

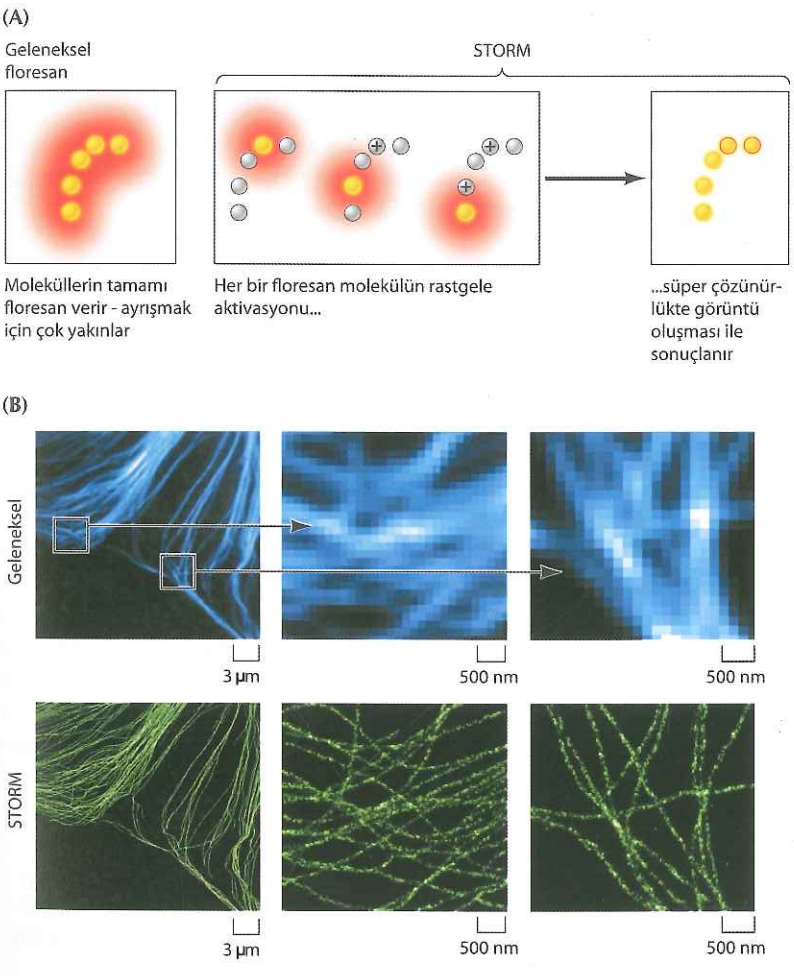
fiksasyon ve boyama prosedürleri artifakt üretebilmektedir ve elektron mikroskobu canlı dokuların incelenmesinde kullanılamamaktadır. Son yıllardaki heyecan verici bir gelişme olan **süper çözünürlüklü ışık mikroskopi** tekniği kırılma engelini aşarak floresan mikroskopsinin çözünürlüğünün sınırlarını 10-100 nm'ye yükseltmiştir: ışık mikroskobunun teorik kırılma limitinden yaklaşık 10 kat daha az.

Çözünürlüğü, görünür ışıkların dalga boyundan moleküler düzeye değiştiren floresan prob kullanımına dayalı çeşitli süper çözünürlüklü ışık mikroskopi yöntemleri geliştirilmiştir. Bu duruma verilebilecek en iyi örnek, yaklaşık 20 nm çözünürlüğe sahip olan ve 2006 yılında geliştirilen STORM (Rasgele optik yeniden yapılandırma mikroskobu: *stochastic optical reconstruction microscopy*) yöntemidir. STORM ve ilişkili yöntemler, binlerce veya milyonlarca bireysel floresan molekülün bir araya getirilmesi ile yüksek çözünürlüklü görüntü oluşturması prensibi ile çalışmaktadır. (**Şekil 1.39**). Standart bir floresan mikroskopide, bir örnekteki bütün floresan probler aynı zamanda floresan ışığı yaymaktadır. Her bir molekülün floresan görüntüleri üst üste binerek, ışığın kırılması ile sınırlandırılmış çözünürlükte bulanık bir görüntü verirler. Buna karşın, STORM, karanlık ve floresan durumlar arasında geçiş yapan floresan probları kullanır. Her hangi bir zamanda, floresan probun

Bilgi İçin

2014 Kimya Nobel ödülü yüksek çözünürlüklü ışık mikroskobunun keşfinden dolayı Eric Betzing, Stefan Hell ve William Moerner'e verildi.

Video 1.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v1.2
Süper Çözünürlüklü Işık Mikroskobu Yüksek çözünürlüklü mikroskop tekniği, görülür ışığın kırılarak yansıma limitinden daha yüksek çözünürlükte görüntülerin yakalanmasına imkan vermektedir.



Şekil 1.39 Süper çözünürlüklü ışık mikroskobu (A) Konvansiyonel floresans mikroskoplarında, örnekteki bütün floresan moleküller aynı anda ışıma yapar ve bulanık bir görüntü verirler. STORM'da probların yalnızca küçük rastgele bir kısmı herhangi bir zaman içinde ışıma yapar. Bu, her bir floresan molekülden zaman içerisinde elde edilen çok sayıda görüntü birbirinden çözümlenir ve süper çözünürlüklü görüntü bileşenleri oluşturulur. (B) Mikrotübülerin konvansiyonel ve STORM mikroskobi karşılaştırmaları. (M. Bates'den alınmıştır, 2007. Science 317:1749; B. Huang'ın izni ile, Harvard Üniversitesi)

yalnızca küçük tesadüfi bir fraksiyonu ışıma yapar, öyleki, bireysel floresan molekül bir diğerinden gelmiş olabilir. Zaman içerisinde bu şekilde çok sayıda görüntünün yakalanması bir seri anlık resim verir, her resimde farklı bireysel moleküller ışıma yapmaktadır. Bu çok sayıdaki görüntü, kompozit bir resim oluşturmak üzere bir araya getirilebilir, ki bu görüntünün çözünürlüğü, ışın kırılmasından ziyade, yerleştirilen her bir floresan molekülün hassasiyeti ile sınırlıdır.

Süper çözünürlüklü mikroskopi metodunun kapsamı; üç boyutlu görüntü, çok sayıda farklı molekülün farklı renkte floresan problar kulanılarak eş zamalı görüntülenmesi ve canlı hücrelerin süper çözünürlüklü görüntülenmesi alanlarını kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Hücre iskeleti yapısına ek olarak, süper çözünürlüklü mikroskopi; çekirdek, kromatin, hücre yapışma bölgeleri ve plazma zarının ince detaylarının görülmesini sağlamıştır. Gelecekteki araştırmaların, hücre içindeki moleküler olayların görüntülenmesine imkan verecek, günümüzdeki mevcut metodlardan dahi daha yüksek çözünürlükteki metodları geliştirmesi muhtemeldir.

Hücreyi alt bileşenlerine ayırma

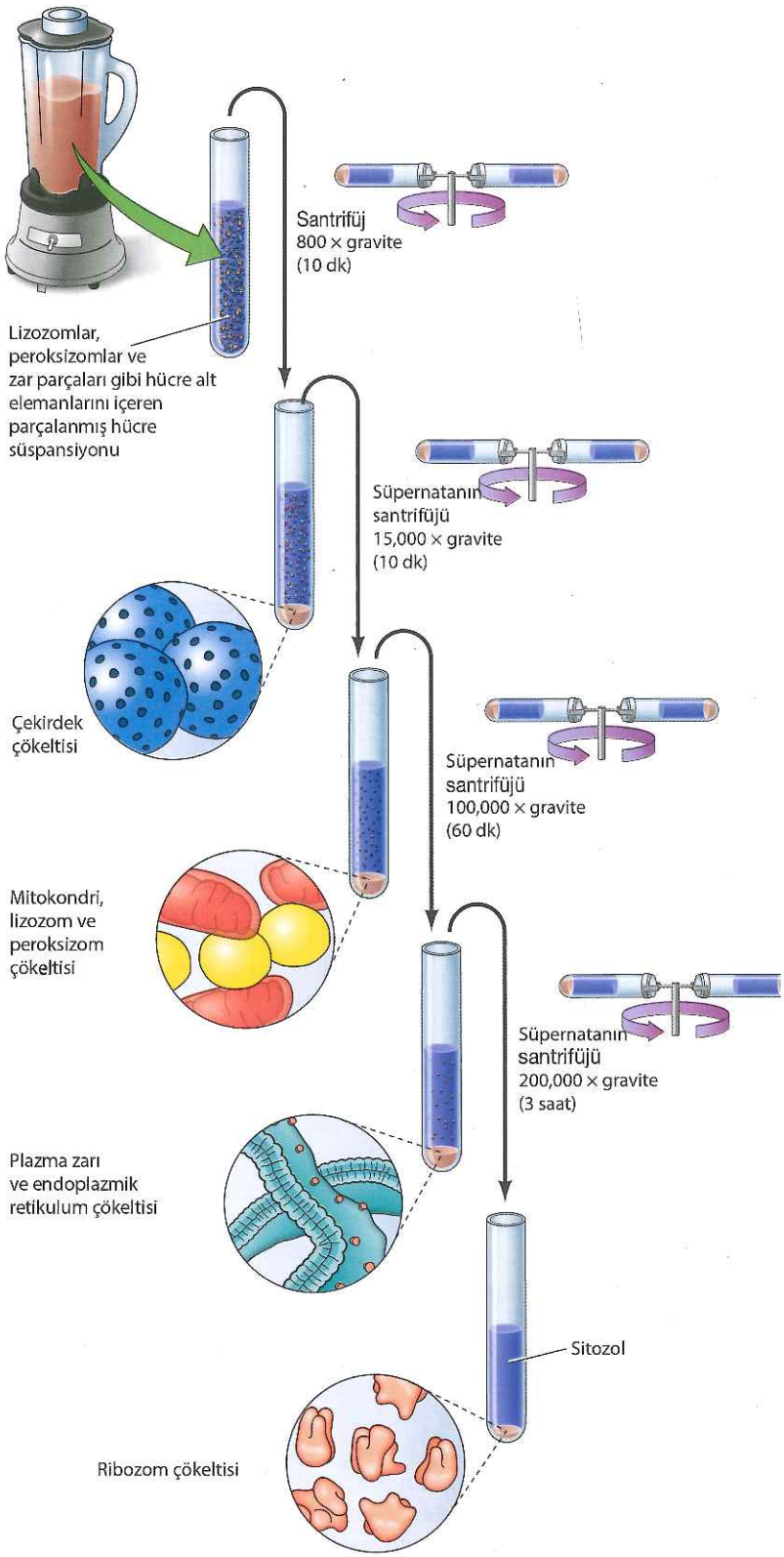
Animasyon 1.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a1.1
Hücreyi Alt Bileşenlerine Ayırma
Hücrelerin sonikasyonla parçalanmasından sonra, hücre içi bileşenleri farklı tip santrifüjleme yöntemleri ile fraksiyonlarına ayrılır.

Elektron mikroskobu, hücre yapısının ayrıntılı görüntülenmesine olanak sağlamasına karşın, ökaryot hücrelerin çeşitli bileşenlerinin işlevlerinin tanımlanması için mikroskop tek başına yeterli değildir. Hücre içi organellerin fonksiyonları ile ilgili birçok sorunun yanıtlanabilmesi için, ökaryotik hücrelerin organellerini, biyokimyasal çalışmalarda kullanılabilecek şekilde, izole etmek gerektiği kanıtlanmıştır. Bu, genellikle, 1940 ve 1950'li yıllarda Albert Claude, Christian de Duve ve arkadaşları tarafından, hücrelerin bileşenlerini boyut ve yoğunluklarına göre ayırmak amacıyla geliştirilmiş olan **diferansiyel santrifügasyon** yöntemiyle sağlanır.

Hücrenin alt birimlerine ayrıştırılmasında ilk adım, hücrenin iç bileşenlerine zarar vermeden plazma zarının parçalanmasıdır. Bunun için, sonikasyon (yüksek frekansta sese maruz bırakma), mekanik homojenizatör ile öğütme veya yüksek hızda blender uygulaması gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu işlemlerin tümü, plazma zarlarını ve endoplazmik retikulumu küçük parçalara ayırırken, hücrenin diğer bileşenlerine (nukleus, lizozomlar, peroksizomlar, mitokondriler ve kloroplastlar gibi) zarar vermemektedir.

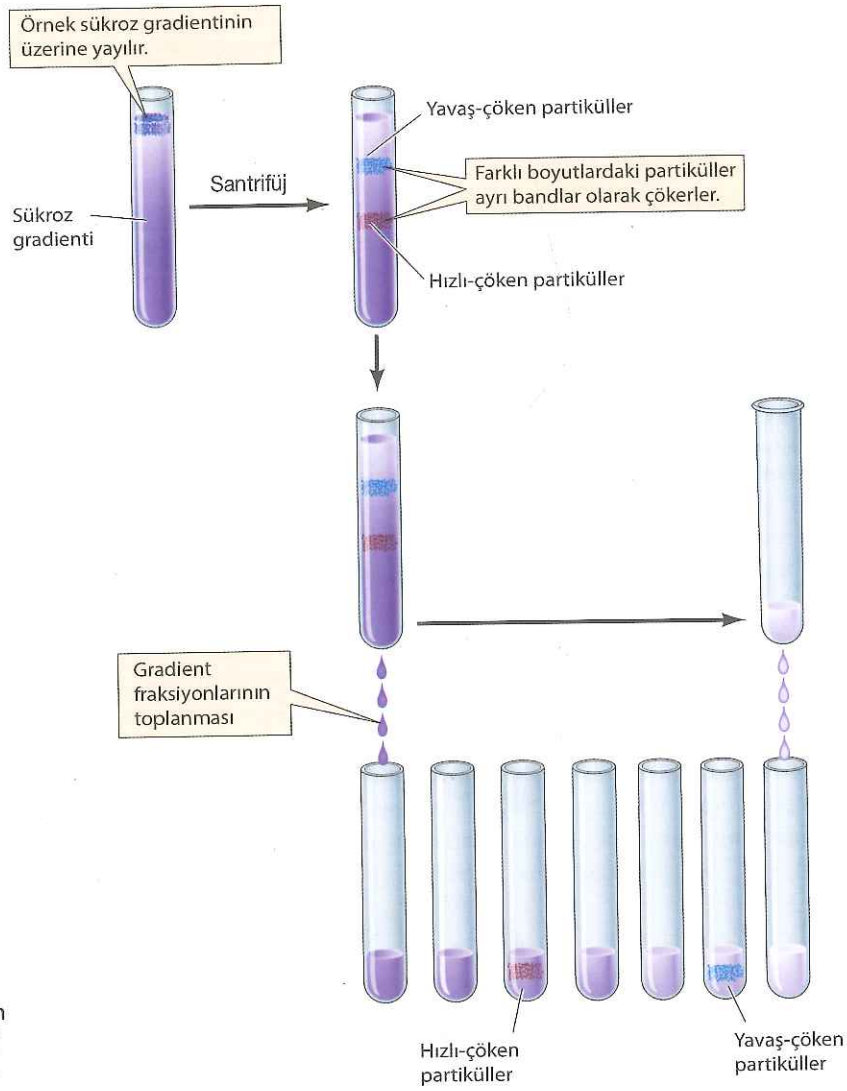
Parçalanmış hücre süspansiyonu (lizat ya da homojenat olarak adlandırılır), yerçekiminden 500,000 kat daha büyük bir kuvvet oluşturmak için, örnekleri çok yüksek hızlarda (100,000 rpm üzeri) çeviren bir ultrasantrifügasyon yardımıyla, bir dizi santrifügasyonla bileşenlerine ayrılır. Bu kuvvet, hücre bileşenlerinin büyüklüklerine ve yoğunluklarına bağlı olarak, en büyük ve en ağır olan en hızlı çökecek şekilde, santrifüj tüpünün dibine doğru hareket etmelerine ve bir çökelti oluşturmalarına (sedimantasyon denilen bir olay) sebep olur (**Şekil 1.40**). Hücre homojenatı genellikle, düşük bir devirde santrifüjlenir, böylece, sadece parçalanmamış hücreler ve nükleuslar gibi en büyük

Şekil 1.40 Hücreyi alt bileşenlerine ayırma Hücreler patlatılır ve hücre alt bileşenleri, artan hızlarda bir dizi santrifügasyonla ayrılır. Her santrifüjleme sonrasında, tüpün dibine çökmüş olan organeller çökelti ile alınır. Daha sonra süpernatan (arda kalan solüsyon) daha yüksek bir devirde tekrar çevrilerek sıradaki büyük organel çöktürülür.


Santrifüj
800 × gravite
(10 dk)
Lizozomlar, peroksizomlar ve zar parçaları gibi hücre alt elemanlarını içeren parçalanmış hücre süspansiyonu
Süpernatanın santrifüjü
15,000 × gravite
(10 dk)
Çekirdek çökeltisi
Süpernatanın santrifüjü
100,000 × gravite
(60 dk)
Mitokondri, lizozom ve peroksizom çökeltisi
Süpernatanın santrifüjü
200,000 × gravite
(3 saat)
Plazma zarı ve endoplazmik retikulum çökeltisi
Sitozol
Ribozom çökeltisi

hücre içi organeller çöker. Bu şekilde düşük hızdaki bir santrifüjle oluşan çökeltiden zengin bir nükleus fraksiyonu elde edilirken, diğer hücre bileşenleri süpematanda (geri kalan çözelti) asılı durumda kalır. Süpernatan daha sonra daha yüksek devirde santrifüjlenerek, mitokondriler, kloroplastlar, lizozomlar ve peroksizomlar çöktürülür. Süpernatanın daha da hızlı devirde yeniden santrifüjlenmesi ile, plazma zarı ve endoplazmik retikulum parçaları çöktürülür. Daha da hızlı bir devirde dördüncü bir santrifüjleme ribozomları çöktürür ve geride, sadece, sitoplazmanın çözünen kısmı (sitozol) kalır.

Diferansiyel santrifüj ile, zenginleşmiş fakat hala saf olmayan organel fraksiyonları elde edilir. Daha ileri düzeyde bir saflaştırma, organellerin, sükroz gibi yoğun bir maddenin gradienti içerisinden geçirilerek çöktürüldüğü, **yoğunluk-gradient santrifügasyonu** ile elde edilebilir. **Hız santrifügasyonunda**, başlangıç materyali, sükroz gradientinin üzerine, tabaka oluşturacak biçimde eklenir (**Şekil 1.41**). Farklı büyüklükteki partiküller, gradiyent içerisinden geçerken farklı hızda çökerler ve ayrı bandlar



Şekil 1.41 Yoğunluk gradientinde hız santrifügasyonu Örnek, sükroz gradientinin üzerine yayılır ve farklı boyutlardaki partiküller, gradient içerisinde ayrı bandlar halinde çökerler. Birbirinden ayrılan partiküller daha sonra, tüpün dibini delip damlaları toplayarak, basitçe, ayrı fraksiyonlar halinde elde edilir.

halinde yürürler. Santrifügasyondan sonra belirli gradient fraksiyonlarının toplanmasıyla, mitokondriler, lizozomlar ve peroksizomlar gibi, benzer büyüklükteki organelerin ayırt edilmesi sağlanır.

Yoğunluk gradientlerinde **denge santrifügasyonu**, hücre altı bileşenlerinin, büyüklük ve biçimlerinden bağımsız olarak, yüzme (buoyant) yoğunluğu temeline göre ayrıştırılması amacıyla kullanılabilir. Bu işlemde örnek, yüksek konsantrasyonlu sükroz ya da sezyum klorid gradientinde santrifüj edilir. Çökme hızlarına göre ayılmaktan ziyade, örnek partiküller, yüzme yoğunlukları kendilerini çevreleyen sukroz veya sezyum klorid konsantrasyonu ile denge konumuna ulaşana kadar santrifüj edilirler. Denge santrifüjü değişik tiplerdeki zarların birbirinden ayrılmasında kullanılabildiği gibi, farklı izotoplarla işaretlenmiş makro molekülleri ayırt edebilecek kadar da duyarlıdır. Bölüm 3'de bahsedilen klasik bir örnek, ağır ve hafif azot izotopları (^{15}N ve ^{14}N) içeren DNA moleküllerinin, DNA replikasyonunun analizi amacıyla, sezyum kloridli denge santrifügasyonu ile ayrılmasıdır.

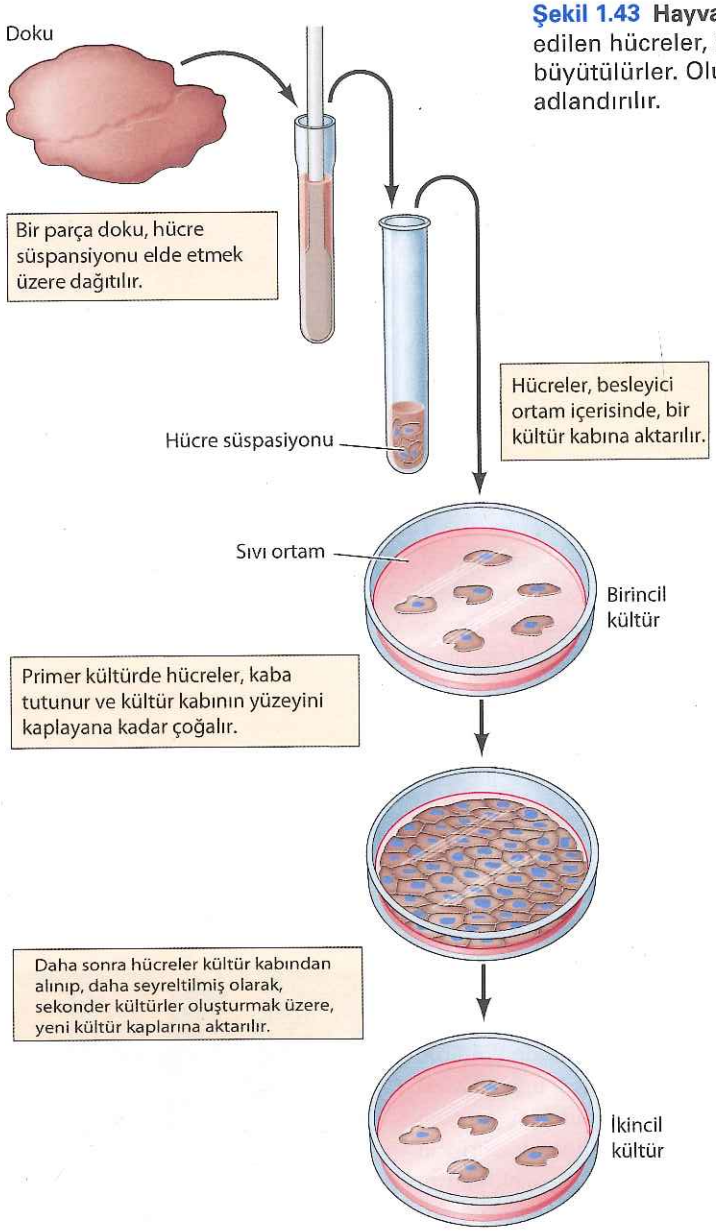
Hayvan hücrelerinin kültürde üretilmesi

Hücrelerle çalışılabilmesi, büyük ölçüde, laboratuvarda ne kadar kolay çoğaltılabileceklerine ve kullanılabilirliklerine bağlıdır. Bu işlem her ne kadar, bakterilerin veya mayaların kültüründen teknik olarak çok daha zor ise de, bir çok hayvan ve bitki hücre çeşidi kültürde çoğaltılabilir ve ustalıkla kullanılabilir. Bu gibi *in vitro* hücre kültürü sistemleri, bilim adamlarına, hücre gelişimi ve farklılaşması üzerine çalışma imkanı vermesinin yanı sıra, gen yapısının ve fonksiyonlarının anlaşılması için gerekli olan genetik incelemelere de olanak sağlamıştır.

Hayvan hücre kültürleri, bir parça dokuyu hücrelerine ayırıp, besi ortamı içeren kültür kabına süspansiyon halinde ekleyerek başlatılır. Fibroblastlar ve epitel hücreleri gibi bir çok hayvan hücre tipi, hücre kültürü için kullanılan kabın plastik yüzeyine tutunarak çoğalır (**Şekil 1.42**). Hızla çoğalan hücreler içermeleri sebebiyle, embriyolar ve tümörler başlangıç materyali olarak sıklıkla kullanılırlar. Embriyo fibroblastları kültürde oldukça iyi üremeleri nedeniyle, en yaygın olarak kullanılan hayvan hücresi tiplerindendir. Bununla birlikte, uygun koşullar altında, bir çok farklı hücre tipi de kültürde çoğaltılabilir ve böylece, kontrollü deneysel koşullarda farklılaşan özellikleri incelenebilir. **Embriyonik kök (ES) hücreler** özellikle değinilmesi gereken bir örnektir. Erken embriyodan alınarak kültürü hazırlanan bu hücreler, erişkin organizmalarda mevcut tüm hücre tiplerine farklılaşabilme özelliklerini korurlar. Sonuç olarak, embriyonik kök hücreler, fare gelişiminde görevli çeşitli genlerin işlevlerinin araştırılmasında önemli rol oynamışlardır. İnsan hastalıklarında, transplantasyon uygulamaları için doku kaynağı sağlayarak, tedaviye katkıda bulunabilme olanağı sunmaktadır.

Hayvan hücrelerinin çoğalması için gerekli kültür ortamı, bakteri ve mayaların çoğalmasını sağlamak için yeterli olan minimal ortamdan çok daha karmaşıktır. Hayvan hücre kültürlerinde kullanılan ortam, tuzlara ve glukoza ek olarak, hücrelerin kendilerinin yapamadığı çeşitli amino asitleri ve vitaminleri de içerir. Kültürdeki hayvan hücrelerinin büyüme ortamı, hücre bölünmesini uyarmak için gerekli polipeptid büyüme faktörlerinin kaynağı olan serum içerirler. Bu büyüme faktörlerinden birkaçı tanımlanmıştır. Çok hücreli organizmalarda, farklı hücrelerin birbiriyle iletişim kurmasını sağlayan sinyaller oluşturarak, hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının önemli düzenleyicisi görevini yaparlar.

Şekil 1.42 Kültürdeki hayvan hücreleri Bir kültür kabının yüzeyine tutunmuş insan fibroblastlarının taramalı elektron mikroskop görüntüsü. (Yapay renk eklenmiştir.)



Şekil 1.43 Hayvan hücresi kültürü Bir dokudan elde edilen hücreler, kültür kaplarında ve besleyici ortam içinde büyütülürler. Oluşturulan ilk kültür primer kültür olarak adlandırılır.

Örneğin, hayvan deri fibroblastlarının önemli bir fonksiyonu, bir kesilme ya da yaralanma sonucu oluşan hasarı onarmak üzere çoğalmalarıdır. Kanın pıhtılaşması sırasında plateletlerden salınan büyüme faktörü, hasarlı doku yakınındaki fibroblastların çoğalmasını uyararak, bölünmelerini başlatır. Farklı büyüme faktörlerinin tanımlanması, çeşitli hücrelerin serumsuz ortamlarda (ilgilenilen hücrenin çoğalabilmesi için gerekli büyüme faktörünün, serum yerine kullanıldığı ortam) çoğaltılmasına olanak sağlamıştır.

Bir dokudan hazırlanan başlangıç hücre kültürlerine **birincil kültürler** denir (**Şekil 1.43**). Birincil kültürdeki hücreler, genellikle, kültür kabının yüzeyini kaplayıncaya kadar çoğalırlar. Daha sonra, kültür kabından alınır ve seyreltilerek, ikincil kültürleri oluşturmak üzere, tekrar kültür kaplarına konur. Bu işlem defalarca tekrarlanabilir, ancak normal hücrelerin çoğu kültürde sonsuza kadar çoğaltılamaz. Örneğin, normal insan fibroblastları genellikle, 50 ile 100 kez populasyonu ikiye katlar, sonra üremeyi durdurur ve ölürler. Buna karşın, embriyonik kök hücreler ve tümörlerden alınan hücreler çoğunlukla, kültürde süresiz çoğalırlar ve sürekli ya da ölümsüz **hücre hatları** olarak tanımlanırlar. Buna ilave olarak, normal kemirgen fibroblast kültüründen çok sayıda ölümsüz hücre hattı izole edilmiştir. Benzerlerinin çoğunun yaptığı gibi ölmek yerine, bu kültürlerdeki birkaç hücre sınırsız olarak çoğalmayı sürdürür ve tümörlerden elde edilenlere benzeyen hücre hatları oluştururlar. Bu tür sürekli hücre hatları, kullanışlı, klonlanabilen ve laboratuvarda sonsuz çoğaltılabilen, sürekli ve tek tip hücre kaynağı sağladıklarından, bir çok deneyde özellikle kullanılmıştır. Oluşturulan ilk insan hücre hattı, 1951'de serviks kanserinden izole edilen ve binlerce laboratuvarda insan hücre biyolojisinin çalışılması için kullanılmış olan HeLa hücreleridir.

Optimal koşullar altında dahi, aktif olarak çoğalan çoğu hayvan hücresi 20 saat aralarla bölünür, ki bu, mayanın bölünme süresinden 10 kat daha uzundur. Bu nedenle, hayvan hücre kültürleriyle araştırma yapmak, bakteri ve mayalara göre daha zordur ve daha fazla zaman alır. Örneğin; tek hücreden üretilen *E. coli* veya maya kolonileri bir gecede ortaya çıktığı halde, tek bir hayvan

Anahtar Deney

HeLa Hücreleri

Tissue Culture Studies of the Proliferative Capacity, of Cervical Carcinoma and Normal Epithelium
George O. Gey, Ward D. Coffman and Mary T. Kubicek
Johns Hopkins Hospital and University, Baltimore, MD
Cancer Research, Volume12, 1952, pages 264-265

Bağlam

İlk hücre kültürleri, doku fragmanlarından alınan ve plazma pıhtısı içine gömülen hücrelerin çoğalması şeklinde idi, ki bu, deneysel incelemeler için uygun olmaktan çok uzak bir kültür sistemiydi. En büyük ilerleme, 1940'ların sonlarında, izole edilmiş hücrelerin kültür kaplarının yüzeylerine tutunarak çoğaldıkları hücre hatlarının geliştirilmesiydi. Bu hücrelerin ilki, 1942 yılında oluşturulan ve L hücreler olarak adlandırılan fare hücre hatlarıydı. Ancak, kanser araştırmalarında model olarak çok fazla istenmesine rağmen, insan orijinli hücre hatlarının oluşturulması oldukça zor olmuştur. Birçok teşebbüse rağmen, bilim insanları insan hücrelerini birkaç haftadan daha uzun süre büyütebilmeyi başaramamıştır. İlerleme 1951'de George Gey ve arkadaşlarının servikal kanserler dokusundan ilk insan hücre hattını, HeLa hücreleri, oluşturmalarıları ile elde edildi.

Deneyler

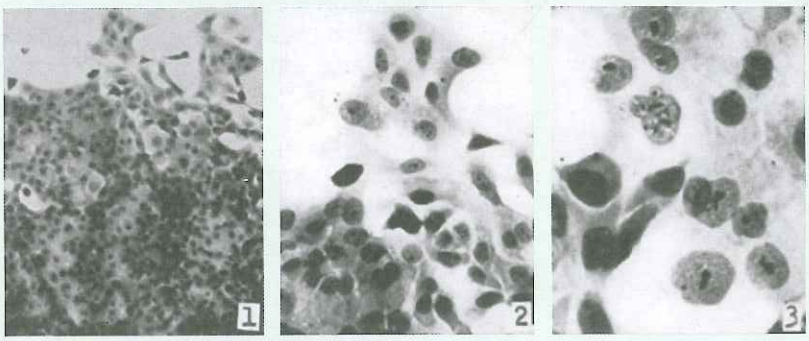
HeLa hücreleri, Şubat 1951'de Henrietta Lacks isimli 30 yaşındaki bir kadından alınan servikal biyopsiden kütüre edildi. Gey ve arkadaşları, daha önce çok sayıda kanser örneğindeki kültür denemelerinde yaptıkları gibi Henrietta Lacks'ın doku örneğini tavuk plazması, dana embriyonik izolatı, insan göbek bağı kanı içeren besi ortamlarında kültüre ettiler. Anca, daha önceki denemelerin aksine, Henrietta Lacks'ın kanser doku örneğinden alınan hücreler hızla büyüdü ve büyümeye devam ederek ilk insan kanser hücre hattını olan HeLa hücrelerini oluşturdu. Bu hücre hatının arkasındaki hikaye ve erken hücre kültürü çalışmalarının arkasındaki hikayelerin büyük bir bölümü Rebecca Skloot tarafından kaleme alınan "*The Immortal Life of Henrietta Lack's*, 2010" da anlatılmıştır.

Etki

HeLa hücreleri, kanser araştırmalarında ve diğer insan hücre biyolojisi çalışmalarında en yaygın kullanılan hücre hattı olmuştur. Poliovirüslerin HeLa hücrelerinin içinde kalaylıkla çoğalabilmesinden dolayı, HeLa

George O. Gey

hücrelerinin kullanıldığı en önemli ilk çalışma polio aşısının geliştirildiği çalışma olmuştur. HeLa hücreleri günümüzde de; DNA replikasyonu, gen ekspresyonu, hücre bölünmesi, viroloji, kanser ve hücre haberleşmesi gibi insan moleküler ve hücresel biyolojisinin neredeyse bütün alanlarında kullanılmaya devam edilmektedir. Öneminin bir göstergesi olarak, HeLa hücreleri 70.000' den fazla yayınlanmış araştırma makalesinde kullanılmıştır. Bunun ötesinde, çok sayıda diğer insan hücre hattı oluşturulmuştur ve bu hücre hatları günümüz insan hücre biyolojisi çalışmalarının temelini oluşturmaktadır.

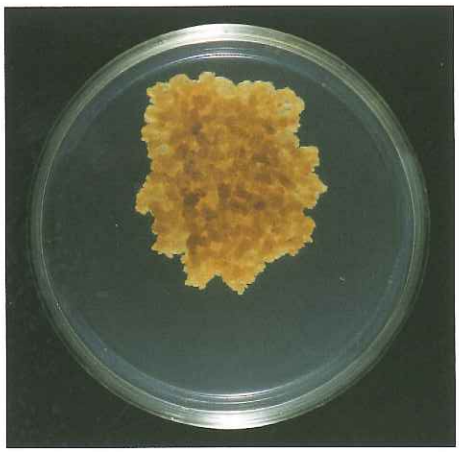


HeLa hücrelerinin 65, 160 ve 250x büyütme ile elde edilmiş mikroskopik görüntü fotoğrafı (Scherer, W. F., J. T. Syverton ve G. O. Gey. 1953. *J. Exp. Med.* 97: 695-710.' dan)

hücresinin görülebilir koloni oluşturması en az bir hafta, hatta daha fazla sürer. Yine de, hücre yapısını ve fonksiyonlarını anlayabilmemiz için, kültürdeki hayvan hücrelerini genetik olarak manuple etmemiz kaçınılmazdır.

Bitki hücresi kültürleri

Bitki hücreleri de, uygun büyüme düzenleyici molekülleri içeren besi ortamı içerisinde büyütülebilir. Hayvan hücrelerinin çoğunun üremesini düzenleyen polipeptit büyüme faktörlerinin aksine, bitki hücrelerinin büyüme regülatörleri,



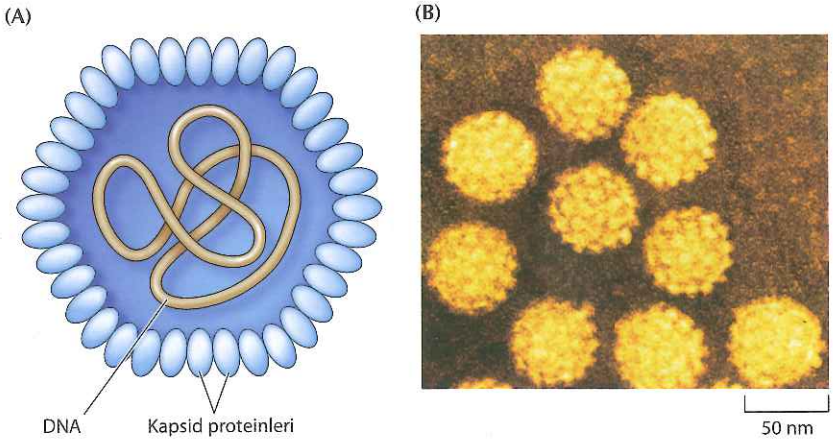
Şekil 1.44 Kültürdeki bitki hücreleri Katı bir ortamda üreyen farklılaşmamış siyah Meksika tatlı mısır hücreleri yığını (kallus).

bitki hücre duvarından geçebilen küçük moleküllerdir. Bu büyüme düzenleyici moleküllerin uygun karışımının sağlandığı koşulda, bir çok bitki hücre tipi kültürde çoğalır ve **kallus** adı verilen farklılaşmamış bir hücre kümesi oluşturur (Şekil 1.44).

Bitki hücrelerinin çoğunun, sonunda bitkininin tümünü oluşturmak için gerekli olacak, farklı hücre ve doku tiplerinden her birini oluşturabilme yetisinde olduklarını belirtmek gerekir. Sonuç olarak, besinlerin ve büyüme düzenleyici moleküllerin uygun kullanımıyla, kültürdeki farklılaşmamış bitki hücreleri, kökler, gövdeler ve yapraklar gibi çeşitli bitki dokularını oluşturmak üzere uyarılabilir. Çoğu zaman, kültürdeki tek bir hücreden bütün bir bitki geliştirilebilir. Kültürde tek hücreden yeni bir bitki oluşturabilmesi, teorik yararının yanı sıra, bitkilerde genetik değişiklikler yapılmasını kolaylaştırır ve tarımsal genetik mühendislikte önemli olanaklar sağlanır.

Virüsler

Virüsler, kendi başlarına replike olamayan, hücre içi parazitlerdir. Konakçı hücreleri enfekte edip, hücre mekanizmasını zorla kullanarak, daha çok virüs partikülü oluşturmak üzere çoğalırlar. En basit şekliyle virüsler, bir protein kılıfla sarılmış olan genomik nükleik asitten (DNA ya da RNA) ibarettir (Şekil 1.45). Hücre fonksiyonlarının incelenmesinde kullanılabilecek basit sistemler olduklarından, virüsler, moleküler ve hücre biyolojisi için önemlidirler. Virüsün çoğalması, enfekte hücrelerin metabolizmasına bağlı olduğu için, virüslerle yapılan çalışmalar hücre biyolojisinin bir çok temel konusuna açıklık getirmiştir. Bakteri virüsleriyle yapılan çalışmalar moleküler genetiğin temel mekanizmalarını anlamamıza büyük ölçüde katkıda bulunmuş ve bitki virüsü (tütün mozaik virüsü) ile yapılan araştırmalar RNA'nın genetik potansiyelini ilk kez göstermiştir. Hayvan virüsleri, ökaryotik hücrelerin çeşitli aktivitelerinin araşırılması için, özel duyarlıkta problar sağlamaktadır.



Şekil 1.45 Bir hayvan virüsünün yapısı (A) Papillomavirüs partikülleri, protein kılıf (kapsid) içerisinde sarılmış küçük bir çembersel DNA molekülü içerir. (B) İnsan papillomavirüs partiküllerinin elektron mikroskop görüntüsü. Yapay renk eklenmiştir.

Moleküler Tıp

Virüsler ve Kanser

Hastalık

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize bir hastalık grubudur. Normal hayvan hücrelerinin çoğalması, organizmanın tamamının ihtiyaçlarına göre sıkı şekilde denetlenir. Buna karşın, kanser hücreleri düzensiz olarak çoğalır ve en sonunda, normal doku ve organları istila ederek fonksiyonlarını engeller. Kanser, Birleşik Devletler'de, ikinci en yaygın ölüm nedenidir (kalp hastalıklarından sonra). Yaklaşık olarak, her üç Amerikalı'dan biri hayatının bir döneminde kansere yakalanacak ve tedavideki önemli gelişmelere rağmen, her dört Amerikalı'dan biri sonunda bu hastalıktan ölecektir. Kanserin sebeplerinin anlaşılması ve kanser tedavisinde daha etkili yöntemlerin geliştirilmesi, bu nedenle, tıp araştırmalarının ana hedefidir.

Moleküler ve Hücresel Temel

Bugün, kanserin, normalde hücre çoğalmasını kontrol eden genlerdeki mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmekte. Bu genlerin tanımlanmasına yol açan en önemli yaklaşım, hayvanlarda kansere neden olan ve prototipi 1911'de Peyton Rous tarafından izole edilen, virüslerle yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Rous, tavuklardaki sarkomların (bağ dokusu kanserleri), bugün Rous sarkoma virüsü veya RSV olarak bilinen bir virüsle bulaştığını buldu. RSV, sadece 10,000 baz çiftlik genoma sahip bir retrovirüs olduğundan, moleküler analizler için, tavuk veya diğer hayvan hücrelerinin kompleks genomlarından çok daha uygundur. Bu gibi çalışmalar en sonunda, virüslerde bulunan ve kanser nedeni olan spesifik bir genin (onkogen) tanımlanmasına ve insanlar dahil tüm omurgalıların normal hücrelerinde de benzer genlerin keşfine yol açtı. İnsanlardaki bazı kanserlere virüslerin sebep olduğu bugün bilinmektedir; diğerleri, ilk kez RSV'de tanımlanmış olan onkogene benzeyen, normal hücre genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır.

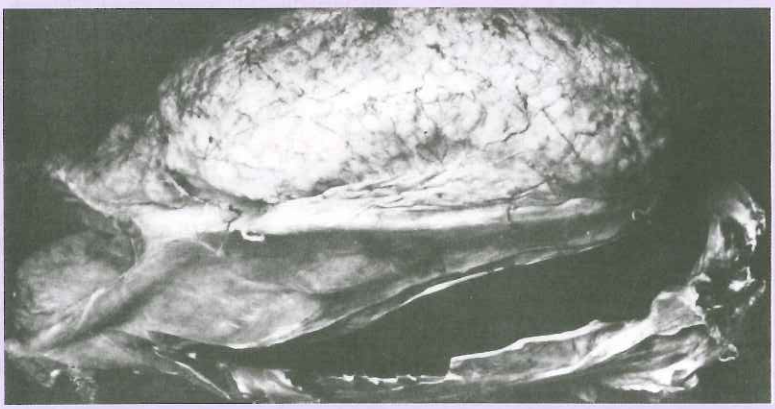
Önlem ve Tedavi

Virüslerin sebep olduğu insan kanserleri; servikal ve diğer anogenital kanserler (papilloma virüsleri), karaciğer kanseri (hepatit B ve C virüsleri) ve bazı lenfoma türleridir (Epstein-Barr virüsü ve insan T-hücresi lenfotropik virüsü). Virüsle indüklenen bu kanserler, dünya çapındaki kanser olgularının yaklaşık olarak %20'sini oluşturur. Aslında, bu kanserler, sorumlu virüse karşı aşılama ile önlenebilir ve hepatit B virüslerine karşı geliştirilen etkin bir aşı ile bu alanda önemli gelişme sağlanmıştır.

Diğer insan kanserlerinin nedeni, normal hücre genlerinde meydana gelen mutasyonlardır, bunlar kalıtımla edinilmez, kişinin yaşam sürecinde ortaya çıkarlar. Kansere neden olan virüslerle yapılan araştırmalar, virüslerin sebep olmadığı kanserlerden sorumlu olan genlerin birçoğunun tanımlanmasını ve kanser gelişiminden sorumlu olan moleküler mekanizmaların anlaşılmasını sağlamıştır. Kanserin moleküler ve hücresel biyolojisi konularında edinilen bilgilerin, kanser tedavisinde kullanılması için önemli çaba harcanmaktadır. Gerçekten, bir insan kanserinin tedavisinde etkili olan ilk ilaç (İmatinib veya Gleevec, Bölüm 19'de tartışılmıştır) RSV'nin onkogenine çok benzeyen bir gene karşı geliştirilmiştir.

Kaynak

Rous, P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent seperable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13: 397-411.



Rous sarkoma virüsünün izole edildiği, transplante edilebilen tümör.

Bakteriler, hızlı çoğalmaları ve küçük genom boyutları nedeniyle moleküler biyoloji araştırmaları için ideal deneklerdir ve bakteri virusları **(bakteriyofajlar)** bakteri genetiği çalışmalarını daha da kolaylaştırır. En önemli bakteriyofajlardan biri, *E. coli*'yi enfekte ederek çoğalan T4'dür. Tek bir T4 partikülü ile enfeksiyon, 20 ile 30 dakika içerisinde yaklaşık olarak 200 yeni virüs partikülünün oluşmasına yol açar. Başlangıçta enfekte olan hücre patlar (erir, liziz) ve yeni hücreleri enfekte edecek olan, yeni oluşmuş virüs partiküllerini ortama salar. Agar ortamında çoğalan bakteri kültüründe T4 replikasyonu, bakteri tabakası üzerinde, eriyen

Şekil 1.46 Bakteriyofaj plakları *E. coli* tabakası üzerinde T4 plakları görülmekte. Her plak tek bir virüs partikülünün replikasyonundan ortaya çıkar.

hücrelerin bulunduğu berrak alanlar (plak) oluşturur (**Şekil 1.46**). Enfeksiyon yapan virüs partiküllerinin üreme ve analiz kolaylığı gibi, viral mutantların– örneğin bir *E. coli* suşunda üreyip diğerinde üremeyen virüsler–izolasyonu da kolaydır. Bu nedenle, moleküler genetik çalışmalarında T4'ün kullanımı *E. coli*'den daha hızlıdır. Dahası, yaklaşık olarak 0.2 milyon baz çifti içeren T4 genomu, *E. coli*'ninkinden 20 kat daha küçüktür ve bu, üzerinde çalışılmasını daha da kolaylaştırır. Diğer bazı bakteriyofajlar, çok daha küçük genoma sahiptirler–en basitleri 3600 nükleotidlik RNA molekülleri içeren. Bakteri virüsleri, bu nedenle, moleküler genetikte son derece kolay deney sistemleri sağlarlar. Moleküler biyolojinin birçok temel kuralının aydınlatılmasına neden olan, büyük oranda, bu virüslerle yapılan çalışmalardır.

Hayvan hücresi genomunun çok daha karmaşık olması nedeniyle, hayvan hücresi ile yapılan araştırmalarda virüsler, bakterilerle yapılan çalışmalara göre çok daha fazla önem kazanmıştır. Bir çok hayvan virüsü, bakteriyofajlarda olduğu gibi, hücre kültürlerinde çoğalır ve plak oluşumu ile incelenebilir. Ayrıca, hayvan virüslerinin genomları karmaşıklık açısından bakteri virüslerinkine benzer (yaklaşık olarak 3,000-300,000 baz çifti arasında değişir) olduğundan, hayvan virüsleri ile çalışmak konakçı hücreleriyle çalışmaktan çok daha kolaydır.

Bilgi İçin

Hayvan virüsleri genelde gen tedavisinde genlerin hücre içine aktarılmasında gen taşıyıcıları olarak kullanılmaktadır. (bkz. Bölüm 4)

Her biri, genetik materyal olarak DNA ya da RNA içeren birçok farklı hayvan virüsü vardır (**Tablo 1.3**). RNA genomuna sahip olan virüslerin çoğu, enfekte ettikleri hücrelerde, RNA kalıbından genomlarının yeni RNA kopyalarını sentezleyerek replike olurlar. Bununla birlikte, **retrovirüsler** olarak adlandırılan bir hayvan virüsü ailesi, virüs partiküllerinde RNA genomu içermelerine karşın, enfekte ettikleri hücrelerde, genomlarının bir DNA kopyasını sentezlerler. Bu virüsler, virüslerin model olarak önemini gösteren iyi bir örnektir, çünkü, şu anda tüm ökaryotlarda da geçerli olduğunu bildiğimiz bir genetik bilgi transfer şekli olan, RNA kalıplarından DNA sentezinin gerçekleştiği ilk kez retrovirüs çalışmalarında gösterilmiştir. Konak hücrenin araştırılmasında, hayvan virüslerinin önemli model olarak kullanıldığı diğer örnekler arasında DNA replikasyonu, transkripsiyon, RNA işlenmesi ve protein taşınması ve salınımı çalışmaları yer almaktadır.

Özellikle belirtmek gerekir ki, bazı hayvan virüsleri ile enfeksiyon, konakçı hücreyi öldürmek yerine, normal hücreyi kanser hücresine dönüştürür. İlk kez Peyton Rous tarafından 1911 yılında tanımlanmış olan, kansere sebep olan bu gibi virüslerle yapılan çalışmalar, sadece kanser hücresiyle ilgili bugünkü hücre ve moleküler biyoloji düzeyindeki bilgileri elde etmemizi sağlamakla kalmamış, aynı zamanda hayvan hücresinin çoğalma ve farklılaşmasını kontrol eden birçok moleküler mekanizmanın aydınlanmasını da sağlamıştır.

Tablo 1.3 Hayvan Virüsü Örnekleri

Virüs ailesi	Temsilci üye	Genom büyüklüğü (bin baz çiftli)
RNA genomlular		
Pikornavirüsler	Poliovirüs	7-8
Togavirüsler	Rubella virüsü	12
Flavivirüsler	Sarı humma virüsü	10
Paramiksovirüsler	Kızamık virüsü	16-20
Ortomiksovirüsler	İnfluenza virüsü	14
Retrovirüsler	İnsan immün yetmezlik virüsü	9
DNA genomlular		
Hepadnavirüsler	Hepatit B virüsü	3.2
Papovavirüsler	İnsan papillomavirüsü	5-8
Adenovirüsler	Adenovirüs	36
Herpesvirüsler	Herpes simpleks virüsü	120-200
Poksvirüsler	Vaksinia virüsü	130-280

ÖZET

Hücrelerin Kökeni ve Evrimi

- ***İlk hücre:*** Hem prokaryot hem de ökaryot, günümüzdeki tüm hücreler tek bir atadan gelmiştir, ilk hücrenin, en az 3.8 milyar yıl önce, kendini eşleyebilen RNA' nın fosfolipid bir zarla çevrilmesiyle ortaya çıktığı sanılmaktadır.

- ***Metabolizmanın evrimi:*** Metabolik enerjinin üretimini sağlayan ilk reaksiyonlar, bir çeşit anaerobik glikoliz formuydu. Daha sonra fotosentezin gelişimini oksidatif metabolizma takip etti.
- ***Günümüz prokaryotları:*** Günümüz prokaryotları, evrimin erken döneminde birbirinden uzaklaşmış olan, arkebakteriler ve bakteriler olmak üzere iki guruba ayrılırlar.

- ***Ökaryot hücreler:*** Prokaryot hücrelerden çok daha büyük ve karmaşık olan ökaryot hücreler; nükleus ve sitoplazmik organele sahiptirler.

- ***Ökaryotların kökeni:*** Ökaryotik hücrelerin, prokaryotik hücrelerin simbiyotik ilişkisinden köken aldığı düşünülmektedir. Ökaryotların genomu, bakterial ve akebakterial genomların füzyonu sunucu gelişmiş olabilir.
- ***Çok hücreli organizmaların gelişimi:*** En basit ökaryotlar, mayalar ve amipler gibi tek hücreli organizmalardır. Çok hücreli canlılar, bu gibi tek hücreli canlılar arasındaki etkileşimden ortaya çıkmış ve hücreler arasında iş bölümü, günümüz bitki ve hayvanlarını meydana getiren çok çeşitli özelleşmiş hücrelerin gelişimine öncülük etmiştir. Bkz. **Video 1.1.**

Deneysel Model Olarak Hücreler

- **E. coli:** Genetik yapılarının basitliği ve çalışma kolaylığı nedeniyle, *E. coli* gibi bakteriler, biyokimya ve moleküler biyolojinin temel prensiplerinin araştırılması için oldukça kullanışlıdırlar.

- ***Mayalar:*** En basit ökaryot hücre olarak, mayalar ökaryot hücre biyolojisinin çeşitli kavramlarını çalışmak için önemli örneklerdir.

- **Caenorhabditis elegans:** Nematod *C. elegans* gelişimsel biyolojide önemli bir model olarak kullanılan, basit, çok hücreli bir organizmadır.
- **Drosophila melanogaster:** Yaygın genetik analizinden dolayı, meyve sineği *Drosophila* ile yapılan araştırmalar, hayvan gelişimini anlamamıza önemli katkı sağlamıştır.
- **Arabidopsis thaliana:** Küçük, çiçekli bir bitki olan *Arabidopsis*, bitki moleküler biyolojisi ve gelişimi ile ilgili çalışmalar için model olarak yaygınlıkla kullanılır.
- ***Omurgalılar:*** Omurgalı hücresinin bir çok tipi, kontrollü laboratuvar koşulları altında incelenebildikleri kültür ortamında çoğaltılabilirler. Nöronlar ve kas hücreleri gibi özelleşmiş hücre tipleri, hücre biyolojisinin belirli konularını araştırmak için kullanışlı model oluştururlar. Kurbağa *Xenopus laevis* ve zebrabalığı, erken omurgalı gelişiminin incelenmesi için önemli modellerdir, fare de genetik analizler için uygun olan memeli türüdür.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

prokaryotik hücre, ökaryotik hücre, RNA dünyası, gen, transkripsiyon, translasyon, fosfolipid, amfipatik, hidrofobik, hidrofilik

adenozin 5'- trifosfat (ATP), glikoliz, fotosentez, oksidatif metabolizma

arkebakteriler, bakteriler, siyanobakteriler, *Escherichia coli (E. coli)*, hücre duvarı, plazma zarı, ribozom

nükleus, mitokondri, kloroplast, lizozom, peroksizom, vakuol, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, hücre iskeleti

endosimbiyoz

mayalar, *Saccharomyces cerevisiae*, epitel hücresi, fibroblast, eritrosit, granulosit, monosit, makrofaj, lenfosit, nöron

Caenorhabditis elegans

Drosophila melanogaster

Arabidopsis thaliana

***Xenopus laevis*, zebra balığı**

ÖZET

Hücre Biyolojisinin Araçları

Işık mikroskopisi: Işık mikroskobu, hücreleri ve hücre altı yapıları görüntülemek ve özel moleküllerin hücre içindeki yerleşimini belirlemek için çeşitli yöntemlerde kullanılır.

rezolüsyon, aydınlık-alan mikroskopisi, faz-kontrast mikroskopisi, diferansiyel interferenz - kontrast mikroskopisi, floresans mikroskopisi, yeşil floresan proteini (GFP), foto-ağartma sonrası floresan ışımanın geri kazanımı (FRAP), floresan rezonans enerji transferi (FRET), konfokal mikroskopi, multi-foton eksitasyon mikroskopisi

Elektron mikroskopi: Işık mikroskopisine göre yaklaşık olarak yüz kat daha büyük olan rezolüsyonu ile elektron mikroskopisi, hücre yapısının detaylarını incelemek için kullanılır.

transmisyon elektron mikroskopisi, elektron tomografi, metal gölgeleme, dondurup çatlatma, tarama elektron mikroskopisi

Süper çözünürlüklü ışık mikroskopisi: Çeşitli süper çözünürlüklü floresan mikroskopisi yöntemi difraksiyon bariyerini kırarak ışık mikroskopisinin çözünürlüğünü 10-100 nm'ye arttırır. Bkz. **Video 1.2.**

süper çözünürlüklü ışık mikroskobisi

Hücreyi alt bileşenlerine ayırma: Ökaryot hücrelerin organelleri, biyokimyasal analizler için, diferansiyel santrifügasyonla izole edilebilir. Bkz. **Animasyon 1.1.**

diferansiyel santrifügasyon, ultrasantrifüj, yoğunluk-gradient santrifügasyonu, hız santrifügasyonu, denge santrifügasyonu

Hayvan hücrelerinin kültürde üretilmesi: Hayvan hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması, hücre üremesi ve farklılaşmasını kontrol eden mekanizmaların incelenmesine imkan vermiştir.

embriyonik kök hücre (ES), primer kültür, hücre hattı

Bitki hücre kültürü: Kültürde bulunan bitki hücreleri, özel hücre tiplerini oluşturmak üzere farklılaşabilir ve bazı durumlarda, tam bir bitkiyi yeniden oluşturabilir.

kallus

Virüsler: Virüsler, hücre fonksiyonunun araştırılmasında basit modeller sağlar.

bakteriyofaj, retrovirüs

ANAHTAR SÖZCÜKLER

Atıf

Hücre
Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Sorular

1. Stanley Miller'in deneyi organik moleküllerin oluşumu ile ilgli ne göstermiştir?
2. Ne tip bir makro molekül kendi replikasyonunu yönetme kapasitesine sahip olabilir?
3. Mitokondrilerin ve kloroplastların, ökaryot hücre öncüleri tarafından yutulan bakterilerden köken aldığı görüşünün kanıtlarını tartışınız.
4. Fotosentez evriminin, daha sonraki oksidatif metabolizma evrimini desteklediği niçin düşünülmektedir?
5. Bir *S. aureus* bakteri hücresinin çapı 1 μm ve insan makrofajının çapı 50 μm olarak verilmektedir. Tek bir insan makrofaj hücresinin içine kaç tane *S. aureus* sığar? Hücrelerin küresel olduğunu farzedin.
6. Hangi model organizma ökaryotik DNA replikasyonunun çalışılması için en basit sistemi sunmaktadır?

7. Memeli embronik gelişiminde yer alan bir geni çalışıyorsunuz. Sizin çalışmanız için en uygun model organizma hangisidir?
8. Örnek, hava yerine yağ içerisinde incelendiğinde ışık mikroskobu ile ne kadar çözünürlük elde edilir? Görünür ışığın dalga boyu 0.5 μm olarak kabul edilmektedir.
9. Laboratuvarınız için bir ışık mikroskobu almak üzeresiniz, iki farklı objektif lensi seçeneğiniz bulunmaktadır. Birinin büyütmesi 100 ve sayısal açıklığı (numerical aperture: *NA*) 1.1'dir. Diğerinin büyütmesi 60 ve sayısal açıklığı 1.3'dür. Fiyatın önemli olmadığını kabul edin. Bu mikroskoplardan hangisi sizin tercihiniz olurdu?
10. Hücre içindeki bir proteinin yerleşimini ve hareketini çalışmada green floresan protein (GFP) kullanmanın floresan işaretli antikor kullanmaya üstünlüğü nedir?
11. Organellerin, sükroz gradientinde hız santrifügasyonu ile ve sükroz gradientinde denge santrifügasyonu ile ayrılmalarını sağlayan, farklı karakteristik özelliklerini tanımlayınız.
12. Hayvan hücre kültürlerinin büyütülmesinde kullanılan besiyerlerinde neden serum sürekli gereklidir?
13. Primer hücre kültürleri ile ölümsüz hücre hatları arasındaki farkı belirtiniz.
14. Embriyonik kök hücrelerin kültürünün yapılabilmesi neden önemlidir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

(Her ana bölüm için en önemli anahtar derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Hücrelerin Kökeni ve Evrimi

Andersson, S. G. E., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. M. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A.-S. Eriksson, H. H. Winkler and C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133-140. [P]

Cech, T. R. 1986. A model for the RNAcatalyzed replication of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83*: 4360-4363. [P]

Darnell, J. E. and W. F. Doolittle. 1986. Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1271-1275. [P]

De Duve, C. 2007. The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nature Rev. Genet.* 8: 395-403. [R]

Dyall, S. D., M. T. Brown and P. J. Johnson. 2004. Ancient invasions: From endosymbionts to organelles. *Science* 304: 253-257. [R]

Joyce, G. F. 2007. A glimpse of biology's first enzyme. *Science* 315: 1507-1508. [R]

Kasting, J. F. and J. L. Siefert. 2002. Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science* 296: 1066-1068. [R]

Lincoln, T. A. and G. F. Joyce. 2009. Self -sustained replication of an RNA enzyme. *Science* 323:1229-1232. [P]

Margulis, L. 1992. *Symbiosis in Cell Evolution.* 2nd ed. New York: W. H. Freeman.

Martin, W. and T. M. Embley. 2004. Early evolution comes full circle. *Nature* 431: 134-137. [R]

Mast, F. D., L. D. Barlow, R. A. Rachubinski and J. B. Dacks. 2014. Evolutionary mechanisms for establishing eukaryotic cellular complexity. *Trends Cell Biol.* 24: 435-442. [R]

Miller, S. L. 1953. A production of amino acids under possible primitive Earth conditions. *Science* 117: 528-529. [P]

Prochnik, S. E. and 27 others. 2010. Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Science* 329: 223-226. [P]

Rivera, M. C. and J. A. Lake. 2004. The ring of life provides evidence for a genome fusion origin of eukaryotes. *Nature* 431: 152-155. [P]

Szostak, J. W., D. P. Bartel and P. L. Luisi. 2001. Synthesizing life. *Nature* 409: 387-390. [R]

Velasco, R. and 85 others. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica Borkh.*) *Nature Genet.* 42: 833-841. [P]

Williams, T. A., P. G. Foster, C. J. Cox and T. M. Embley. 2013. An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature* 504: 231-236. [R]

Wochner, A., J. Attwater, A. Coulson

and P. Bolliger. 2011. Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme. *Science* 332: 209-212. [P]

Deneysel Model Olarak Hücreler

Adams, M. D. and 194 others. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195. [P]

Blattner, F. R. and 16 others. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1462. [P]

Goffeau, A. and 15 others. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546-567. [P]

Hellsten, U. and 47 others. 2010. The genome of the western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science* 328: 633-636. [P]

Howe, K. and 171 others. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498-503. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-945. [P]

Lieschke, G. J. and P. D. Currie. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Rev. Genet.* 8: 353-367. [R]

Meyerowitz, E. M. 2002. Plants compared to animals: The broadest comparative study of development. *Science* 295: 1482-1485. [R]

Mouse Genome Sequencing Consortium. 2002. Initial sequence and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420 : 520-562. [P]

The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815. [P]

The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018. [P]

Hücre Biyolojisinin Araçları

Bowers, W. E. 1998. Christian de Duve and the discovery of lysosomes and peroxisomes. *Trends Cell Biol.* 8: 330-333 [R]

Cairns, J., G. S. Stent and J. D. Watson (eds.). 2007. *Phage and the Origins of Molecular Biologt;, The Centennial Edition*. Plainview, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Chalfie, M. 2009. GFP: lighting up life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 10073-10080. [R]

Claude, A. 1975. The coming of age of the cell. *Science* 189: 433-435. [R]

De Duve, C. 1975. Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189: 186-194. [R]

Flint, S. L L. W. Enquist, V. R. Racaniello and A.M . Skalka. 2009. *Principles of Virology*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press.

Giepmans, B. N . G., S. R. Adams, M. H. Ellisman and R. Y. Tsien. 2006. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312: 217-224. [R]

Hosking, C. R. and J. Lippincott-Schwartz. 2009. The future's bright: imaging cell biology in the 21st *century. Trends Cell Biol.* 19: 553-554. [R]

Huang, B., H. Babcock and X. Zhuang. 2010. Breaking the diffraction barrier: superresolution imaging of cells. *Cell* 143: 1047-1058. [R]

Koster, A. J. and J. Klumperman. 2003. Electron microscopy in cell biology: Integrating structure and function. *Nature Rev. Malec. Cell Biol.* 4: SS6-SS10. [R]

Lippincott-Schwartz, J., N. Altan-Bonnet and G. H. Pa tterson. 2003. Photobleaching and photoactivation: Following protein dynamics in living cells. *Nature Cell Biol.* 5: 57-514. [R]

Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347-358. [R]

Porter, K. R., A. Claude and E. F. Fullam. 1945. A study of tissue culture cells by electron microscopy. *J. Exp. Med.* 81: 233-246. [P]

Rous, P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13: 397-411. [P]

Salmon, E. D. 1995. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5: 154-158. [R]

Skloot, R. 2010. *The Immortal Life of Henrietta Lacks*, Penguin/Random House

BÖLÜM 2

Moleküller ve Zarlar

Hücre Molekülleri 47

Biyolojik Katalizörler Olarak Enzimler 62

Hücre Zarları 70

Anahtar Deney
Polipeptid Zincirlerinin Katlanması 58

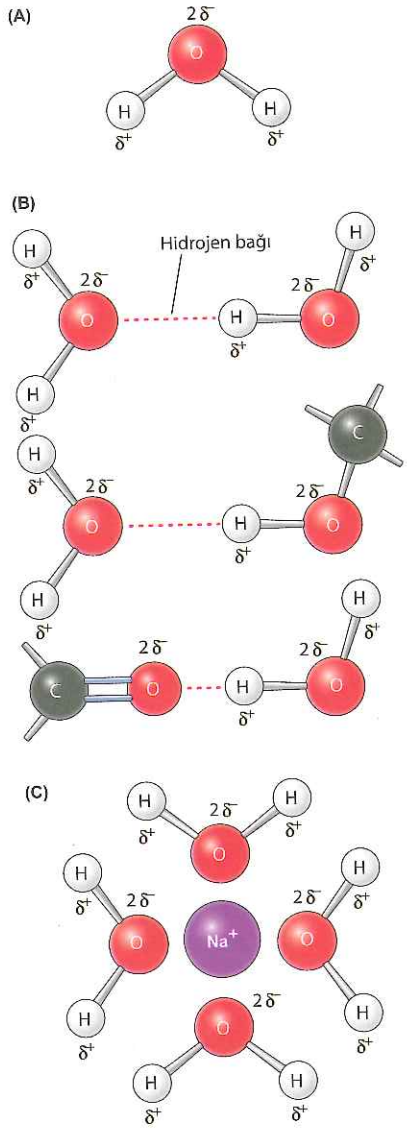
Anahtar Deney
Hücre Zarlarının Yapısı 73

Hücreler son derece karmaşık ve çeşitlilik gösteren yapılardır; yaşamın temelini oluşturan kendi kendini kopyalama kapasitesinin yanı sıra, çok hücreli organizmalarda geniş bir özelleşmiş görevler yelpazesini gerçekleştirirler. Böyle olmakla birlikte, hücreler cansız sistemlerin davranışlarını belirleyen kimya ve fizik kurallarının aynılarına uyarlar. Dolayısıyla, modern hücre biyolojisi hücresel olayları kimyasal ve fiziksel reaksiyonlar çerçevesinde anlamaya çalışır.

Bu bölümde, hücrelerin kimyasal bileşimleri ve tüm hücresel aktivitelerden sorumlu moleküllerin özellikleri ele alınmaktadır. Proteinlere, hemen tüm biyolojik tepkimeleri katalizleyen enzimler olarak görev almaları ve hücre zarlarının başlıca bileşenlerini oluşturmaları gibi hücre içindeki çok çeşitli rolleri nedeni ile, özel bir vurgu yapılmıştır. Hücre zarları, belirli sulu kompartmanları ayıran bariyerler oluşturmaları nedeni ile, hücrenin yapısı ve işlevi açısından kritik bir öneme sahiptirler. Örneğin, plazma zarı bir hücrenin içeriğini dış ortamdan ayırırken, çekirdek zarı da, çekirdeğin içeriğini sitoplazman ayırır. Zarlar hem lipid hem de proteinlerden oluşurlar ve suda çözünen moleküllerin çoğunluğunu geçirmeyip proteinler fosfolipid çift tabakadan moleküllerin seçici taşınmalarını gerçekleştirirler.

Hücre Molekülleri

Hücreler su, inorganik iyonlar ve karbon içeren (organik) moleküllerden oluşmuşlardır. Su, hücrelerde en çok bulunan molekül olup toplam hücre kütlesinin %70'ini ya da daha fazlasını oluşturur. Dolayısıyla, su ile hücrenin diğer bileşenlerinin etkileşimleri biyolojik kimyada büyük önem taşır. Bu çerçevede suyun kritik özelliği, hidrojen atomlarının kısmi pozitif yük, oksijenin de kısmi negatif yük taşıdığı bir polar molekül olmasıdır (**Şekil 2.1**). Su molekülleri, polar özellikleri nedeniyle, kendi kendileri ile ya da, diğer polar moleküller ile hidrojen bağları kurabilirler ve de pozitif ya da negatif yüklü iyonlar ile etkileşebilirler. Bu etkileşimler sonucunda iyonlar ve polar moleküller suda kolayca çözünürler (**hidrofiliktirler**). Buna karşın, nonpolar moleküller, su ile etkileşemediklerinden, sulu ortamda çok zayıf bir çözünürlüğe sahiptirler (**hidrofobiktirler**). Dolayısıyla, nonpolar moleküller kendileri aralarında birleşerek, su ile temaslarını en aza indirgeme eğilimindedirler. Bu bölümde daha sonra tartışılacağı gibi, polar ve nonpolar moleküllerin su ile ve kendileri ile bu tür etkileşimleri, hücre zarları gibi biyolojik yapıların oluşumunda anahtar rol oynar. Hücrenin sodyum (Na^+), potasyum (K^+), magnezyum (Mg^{2+}), kalsiyum (Ca^{2+}), fosfat (HPO_4^{2-}), klorür (Cl^-) ve bikarbonat (HCO_3^-) gibi inorganik



Şekil 2.1 Suyun Özellikleri (A) Su, oksijen atomu üzerinde kısmi negatif yük (δ^-) ve hidrojen atomları üzerinde kısmi pozitif yük (δ^+) taşıyan polar bir moleküldür. Bu polarite (kutuplaşma) nedeniyle, su molekülleri ya kendileri ile, ya da diğer polar moleküller ile hidrojen bağları oluşturabilirler (B); ayrıca, yüklü iyonlar ile etkileşime girebilirler (C).

Animasyon 2.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a2.1
Bağ Oluşumu Şekerlerin, amino asitlerin ve nükleotidlerin polimerizasyonu, sırasıyla, polisakkaridler, polipeptidler ve nükleik asitleri oluşturmaları, kovalent bağlanma yolu ile gerçekleşir.

Bilgi İçin

Yapay tatlandırıcı sükraloz (Splenda) adi şekerin, hidroksil gruplarının bazılarının klorür ile yer değiştirdiği sentetik bir türevidir.

bileşenleri hücre kitlesinin %1 ya da daha azını oluşturur. Bu iyonlar hücre metabolizmasının değişik yönleri ile ilişkilidirler ve hücre işlevinde kritik roller oynarlar.

Ancak, hücrelerin özgün bileşenleri organik moleküllerdir. Bu organik bileşiklerin çoğunluğu, dört sınıf molekülden birine aittir: karbohidratlar, lipidler, proteinler ve nükleik asitler. Proteinler, nükleik asitler ve karbohidratların çoğu (polisakkaridler), yüzlerce ya da binlerce düşük molekül ağırlıklı öncül molekülün; sırasıyla, amino asitler, nükleotidler ve basit şekerlerin birleşmesiyle (polimerizasyon) oluşan makromoleküllerdir. Bu çeşit makromoleküller, birçok hücrenin kuru ağırlığının %80-90'ını oluştururlar. Lipidler, hücrelerin diğer bileşenleridir. Hücre kütlesinin kalan bölümü, makromoleküler öncüllerini de içeren çok çeşitli küçük organik moleküllerden oluşur. Hücrelerin temel kimyası, dört temel organik molekül sınıfının yapıları ve işlevleri ile anlaşılabilmektedir.

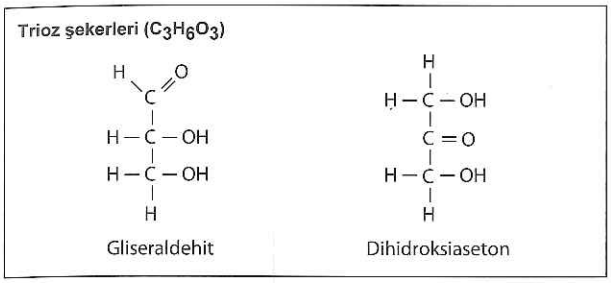
Karbohidratlar

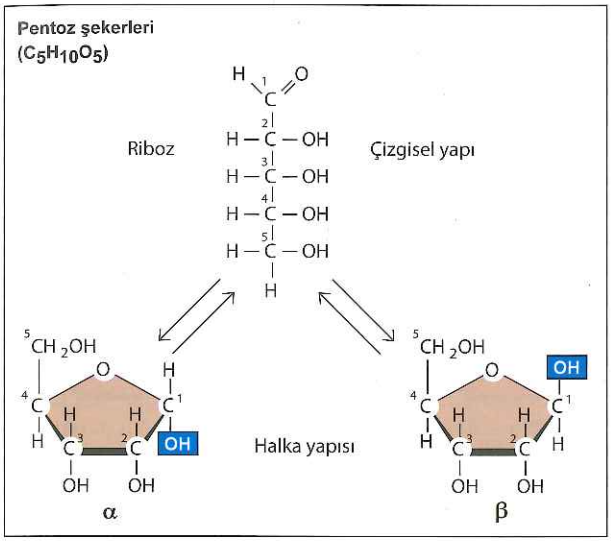
Karbohidratlar basit şekerleri ve de polisakkaridleri kapsarlar. Glukoz gibi basit şekerler hücrelerin temel besin maddesidir. Bölüm 3'de tartışıldığı gibi, bunların yıkılması hem hücresel enerji kaynağını, hem de diğer hücre bileşenlerinin sentezi için başlangıç materyalini sağlarlar. Polisakkaridler şekerlerin depo formudur ve hücrelerin yapısal bileşenini oluşturur. Aynı zamanda, polisakkaridler ile şekerlerin daha kısa polimerleri, hücrelerin komşularına adhezyonu ve proteinlerin uygun intrasellüler hedeflere taşınmaları gibi birçok hücresel tanımayı gerektiren olaylarda "marker" (belirteç) olarak işlev yaparlar.

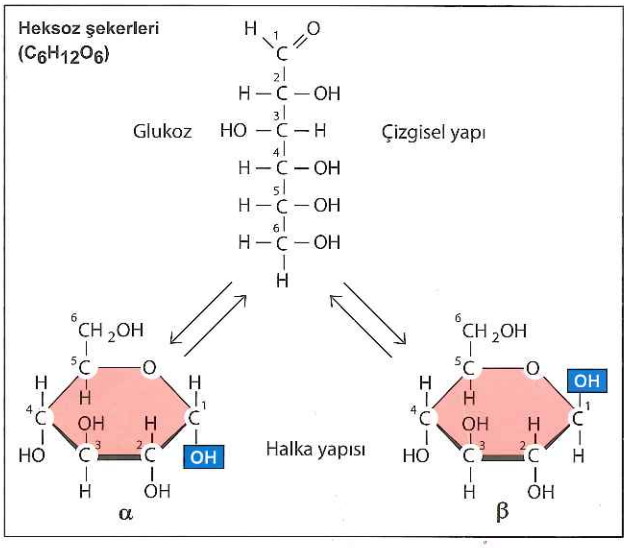
Şekil 2.2'de, seçilmiş bazı basit şekerlerin (**monosakkaridler**) yapıları gösterilmektedir. Bu moleküller için temel formül: $(CH_2O)_n$, olup, bundan "karbohidrat" terimi türemiştir (C = "karbo" ve H_2O = "hidrat"). Altı karbonlu (n=6) şeker olan glukoz ($C_6H_{12}O_6$) hücreler için, hücresel enerjinin temel kaynağını oluşturması yönünden, özellikle önemlidir. Diğer basit şekerler üç ile yedi arasında karbon içerirler ve en sıklıkla rastlananları üç ve beş karbonlu olanlardır. Beş ya da daha fazla karbon atomu içeren şekerler, halkasal yapı oluşturabilirler ve bunlar, hücrede sıklıkla rastlanan formlarıdır. Şekil 2.2'de gösterildiği gibi, halkasal şekerler, 1. karbonun konfigürasyonuna göre, α ya da β olarak iki alternatif formda bulunabilirler.

Monosakkaridler dehidrasyon tepkimeleri ile birleşebilirler; H_2O uzaklaştırılır ve şekerler, karbon atomları arasında oluşan bir **glikozidik bağ** ile birleşirler (Şekil 2.3). Eğer sadece birkaç şeker molekülü birleşmiş ise, oluşan polimer **oligosakkarid** adını alır. Büyük sayıda (yüzler veya binlerce) şeker söz konusu ise, oluşan polimer **polisakkaridler** olarak adlandırılan makromoleküllerdir.

Sık rastlanan iki polisakkarid —**glikojen** ve **nişasta**— sırasıyla, hayvan ve bitki hücrelerinde karbohidratların depo formlarıdır. Hem glikojen, hem de nişasta, tamamen α konfigürasyonundaki glukoz moleküllerinden oluşurlar (Şekil 2.4). Temel bağlanma, bir glukozun 1. karbonu ile, ikinci bir glukozun 4. karbonu arasındadır. Buna ek olarak, hem glikojen, hem de nişastanın bir





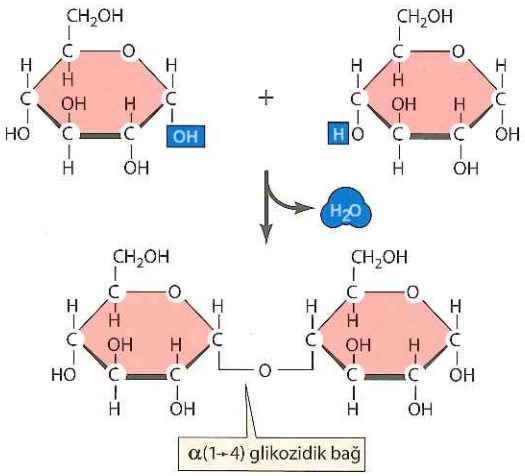


Şekil 2.2 Basit şekerlerin yapısı Üç, beş ve altı adet karbon atomu (sırasıyla trioz, pentoz ve heksoz) taşıyan şeker örnekleri gösterilmektedir. Beş ya da daha fazla karbonlu şekerler, 1. karbonun konfigürasyonuna göre, iki alternatif formda bulunabilen (α ya da β) halkasal yapıyı oluşturabilirler.

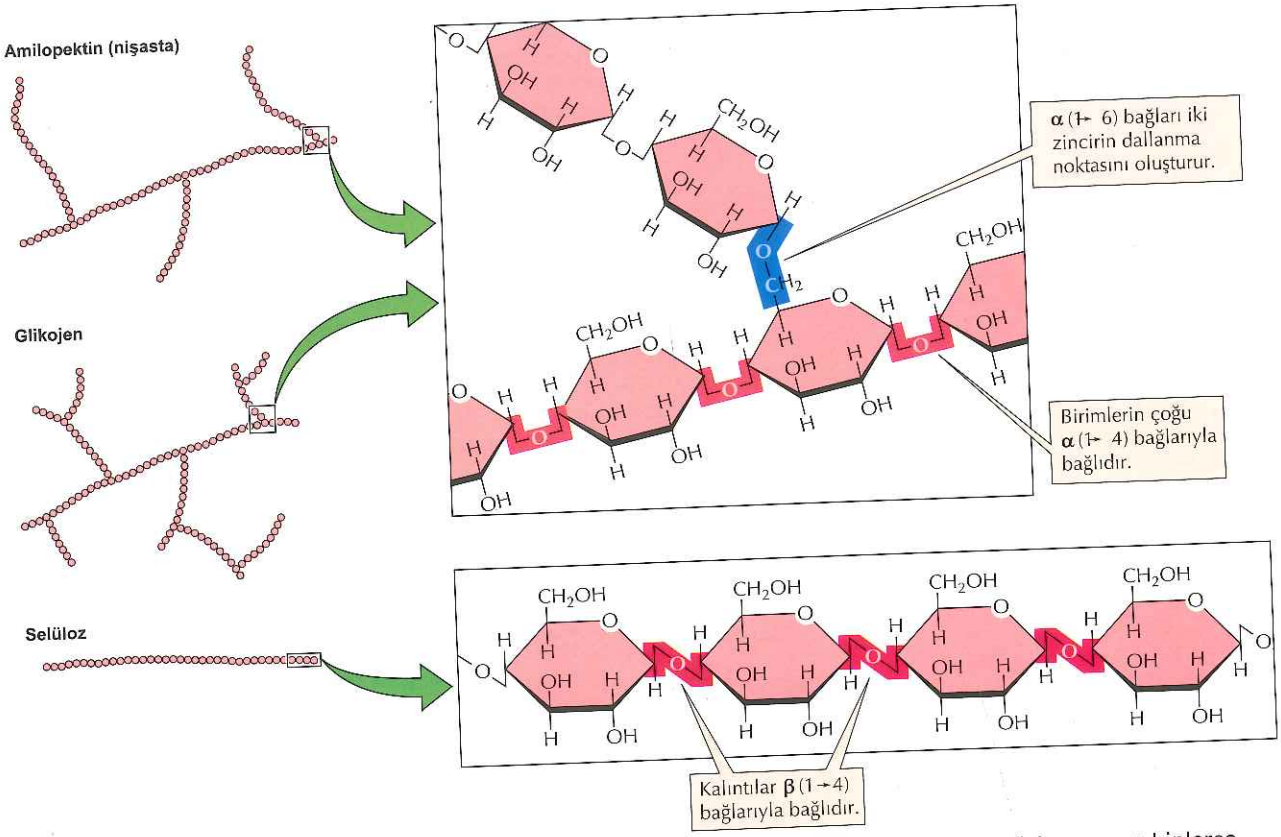
formu (amilopektin), ara ara, bir glukozun 1. karbonu ile ikincinin 6. karbonunun birleştiği α(1→6) glikozidik bağları içerirler. Şekil 2.4'de gösterildiği gibi, bu bağlanmalar, iki ayrı α(1→4) zincirinin birleşmesi ile dallanmaların oluşumunu sağlar. Bu tür dallanmalar, glikojen ve amilopektinde bulunur; diğer bir nişasta formu (amiloz) dallanma göstermeyen bir moleküldür.

Glikojen ve nişastanın yapıları da bu nedenle glukozu depolama işlevleri gibi, temel olarak benzerdir. Buna karşın, **selüloz**, bitki hücresinin temel yapısal komponenti olmak gibi ayrı bir işleve sahiptir. Bu nedenle, belki de şaşırtıcı olarak, selüloz da tamamen glukoz moleküllerinden oluşmuştur. Ancak, selülozda bulunan glukoz molekülleri α konfigürasyonda değil, β konfigürasyondadır ve de selüloz dallanmamış bir polisakkariddir (bkz. Şekil 2.4). Glukoz kalıntılarının α(1→4) yerine β(1→4) bağlarıyla birleşmiş olması, selülozun, uzun ve gerilmiş zincirler oluşturmasını olanaklı kılar ki bu da, büyük mekanik kuvvete sahip yan yana paketlenmiş lifleri şekillendirir. Selülozun hayvandaki karşılığı **kitin** olup, yengeç ve böcek iskeletinde, dış iskeleti oluşturan, değiştirilmiş glukoz kalıntılarının β bağları ile bağlandığı bir polisakkariddir.

Oligosakkarid ve polisakkaridler, enerji depolanması ve hücrenin yapısındaki işlevlerine ek olarak, çeşitli bilgiye dayalı süreçlerde de önemlidirler. Örneğin, oligosakkaridler sıklıkla proteinlere bağlı olup protein katlanmasında önemli rolleri



Şekil 2.3 Glikozidik bağın oluşumu İki basit şeker, (bir molekül suyun çıkarıldığı) dehidrasyon reaksiyonu ile birleşirler. Verilen örnekte, α konfigürasyonundaki iki glukoz molekülü, 1. ve 4. karbon atomları arasında oluşan bağ ile birleşmiştir; bu bağ bu nedenle α(1→4) glikozidik bağ adını alır.



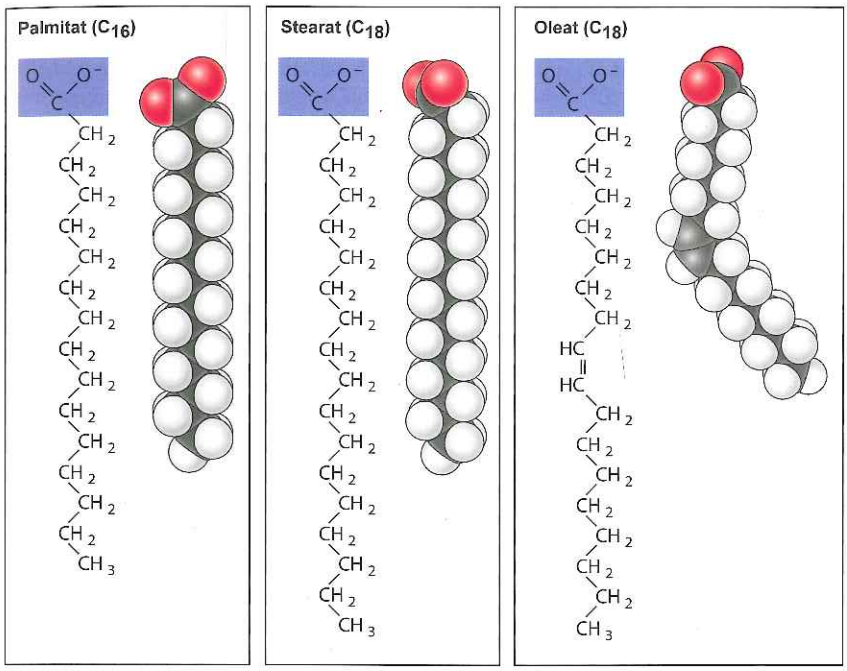
Şekil 2.4 Polisakkaridlerin yapısı Polisakkaridler, yüzlerce veya binlerce basit şekerden oluşan makromoleküllerdir. Glikojen, nişasta ve selüloz moleküllerinin tümü, tamamen glukoz birimlerinden oluşmuştur; glikojen ve nişastada, glukoz molekülleri $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidik bağları ile, selülozda ise $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidik bağlarıyla bağlanmıştır. Glikojen ve nişastanın bir formu (amilopektin) ara ara, iki değişik $\alpha(1\rightarrow4)$ zincirini dallanma noktalarında birleştiren $\alpha(1\rightarrow6)$ glikozidik bağlarını da içerirler.

üstlenmelerinin yanı sıra, proteinlerin hücre yüzeyine hedeflenmelerinde ya da, değişik hücre altı organellere katılmalarında belirteç olarak işlev görürler. Oligosakkaridler ve polisakkaridler hücre yüzeyinde de belirteç görevini üstlenerek, hücre tanınmasında ve çok hücreli organizmaların dokularında hücreler arası etkileşimlerde önem taşırlar.

Lipidler

Lipidler, hücrelerde üç temel role sahiptir. Birincisi, önemli bir enerji depo formunu sağlamalarıdır. İkinci ve de hücre biyolojisi açısından son derece önem taşıyan rolleri, hücre zarlarının temel komponentlerini oluşturmalarıdır. Üçüncüsü de, lipidlerin hücre sinyal iletiminde, hem steroid hormonlar (östrojen ve testosteron gibi) hem de haberci moleküller olarak hücre yüzeyi reseptörlerinden hücre içindeki hedeflere sinyal taşımalarıdır.

En basit lipidler, uzun hidrokarbon zincirlerinden oluşan ve bir ucunda karboksil grubunun (COO^-) bulunduğu, sıklıkla 16 veya 18 karbon içeren **yağ asitleri**'dir (**Şekil 2.5**). Doymamış yağ asitleri, karbon atomları arasında bir



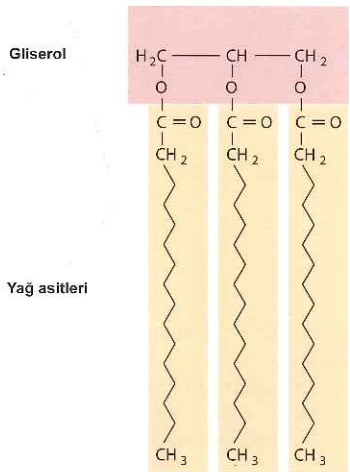
Şekil 2.5 Yağ asitlerinin yapısı Yağ asitleri, karboksil grubu (COO-) ile sonlanan uzun hidrokarbon zincirlerinden ibarettir. Palmitat ve stearat, sırasıyla, 16 ve 18 karbon içeren doymuş yağ asitleridir. Oleat, 9. ve 10. karbonlar arasında bir çift bağ içeren 18 karbonlu doymamış bir yağ asitidir. Çift bağın, hidrokarbon zincirinde bir bükülme oluşturduğuna dikkat ediniz.

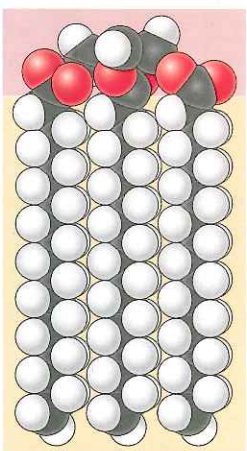
Bilgi İçin

Kandaki yüksek trigliserid seviyeleri, kalp hastalığı ve inme riskindeki artış ile bağlantılıdır.

ya da daha fazla çift bağ içerir; doymuş yağ asitlerinde karbon atomlarının tümü maksimum sayıda hidrojen atomuna bağlıdır. Yağ asitlerinin uzun hidrokarbon zincirleri yalnızca nonpolar C—H bağları içermektedir ki, bunlar su ile etkileşime giremezler. Bu yağ asitlerinin hidrofobik (sudan kaçan) doğası, karmaşık lipidlerin özellikle biyolojik zarları oluşturmak gibi birçok özelliğinden sorumludur.

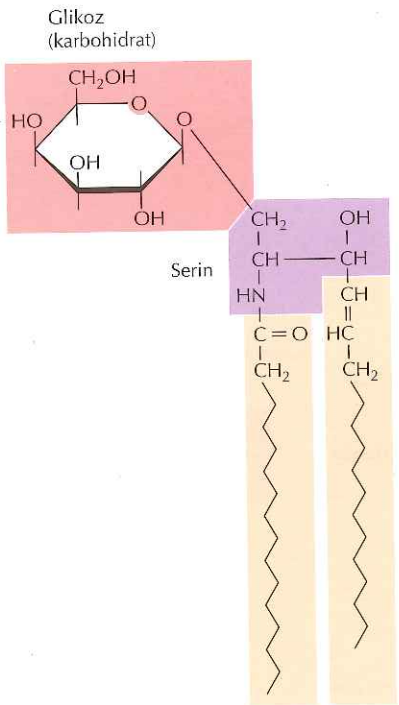
Yağ asitleri **triaçilgliseroller** (**trigliseridler** veya **yağlar** olarak da adlandırılır) şeklinde depolanırlar; bu moleküller, bir gliserol molekülüne bağlı üç adet yağ asitinden oluşmuştur (**Şekil 2.6**). Triaçilgliseroller suda çözünmez ve dolayısıyla sitoplazmada yağ damlacıkları olarak birikir. Gerektiğinde bunlar yıkılıma uğrayarak 3. bölümde daha sonra değinilecek olan enerji üreten tepkimelerde kullanılırlar. Yağların, karbohidratlara göre daha etkin enerji depolama özelliği olması özellikle önemlidir; yıkılan materyal ağırlığı başına iki katından fazla enerji verirler. Bu nedenle, yağlar, karbohidratlara göre, aynı enerjiyi, yarısından az bir vücut ağırlığında depolama olanağı yaratırlar. Bunun da hayvanlar için, mobiliteleri nedeniyle, özellikle önemli olduğu göz önüne alınmalıdır.





Şekil 2.6 Triaçilgliserollerin yapısı Triaçilgliseroller (yağlar) gliserole bağlanmış üç adet yağ asitini içerir. Bu örnekte, üç adet yağ asitinin tümü palmitattır; ancak, triaçilgliseroller sıklıkla, değişik bir yağ asiti karışımını içerirler.

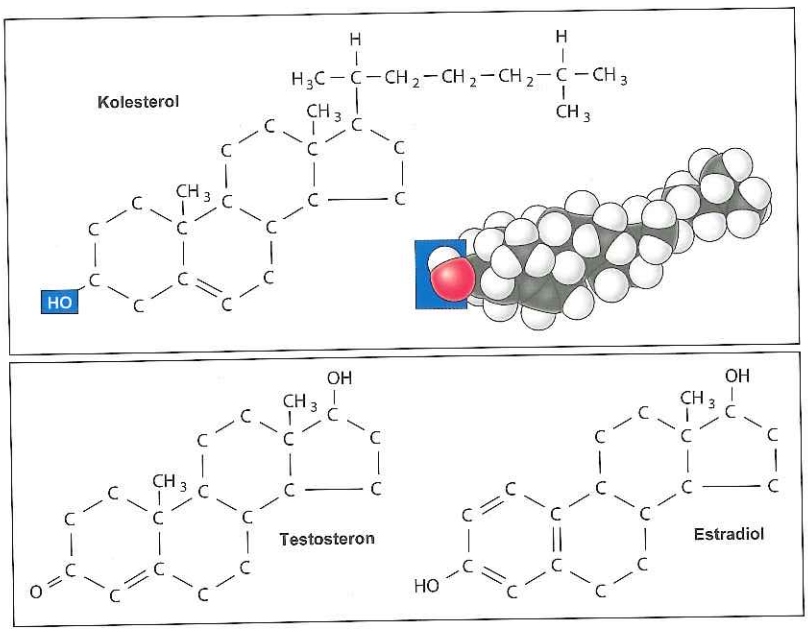
Şekil 2.7 Fosfolipidlerin yapısı Gliserol fosfolipidleri, gliserole bağlı iki adet yağ asiti içerir. Yağ asitleri, birbirinden farklı olabilir. Gliserolün üçüncü karbonu bir fosfat grubu ile bağlanmıştır (fosfatidik asit oluşturur), ki bu da, sıklıkla, küçük bir polar molekül ile birleşir (etanolamin, fosfatidilkolin, fosfatidilserin, veya fosfatidilinositol oluşur). Sfingomyelinde, iki adet hidrokarbon zinciri gliserol yerine serin'den oluşan bir polar baş kısma bağlanmıştır. ▶



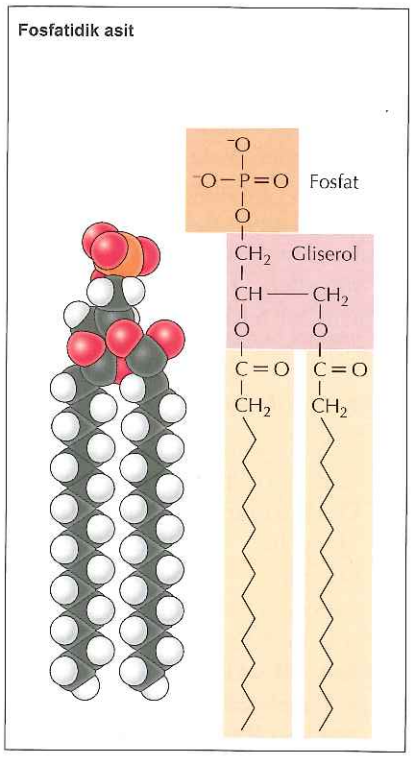
Şekil 2.8 Glikolipidlerin yapısı Serinden oluşmuş ve karbohidrat içeren (örneğin, glukoz) polar baş grubuna, iki adet hidrokarbon zinciri bağlanmıştır.

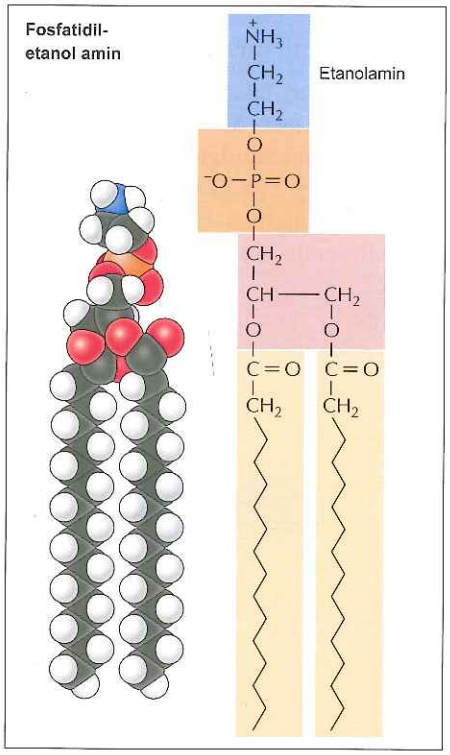
Hücre zarlarının temel komponentlerini oluşturan **fosfolipidler**, polar baş kısım ile birleşen iki yağ asitinden oluşmaktadır (Şekil 2.7). Triaçilgliserolde olduğu gibi, **gliserol fosfolipidler**'in de iki yağ asiti gliserolün karbon atomlarına bağlanır. Gliserolün üçüncü karbonu ise bir fosfat grubuna bağlıdır ki bu fosfat grubu da, sıklıkla, kolin, serin, inozitol veya etanolamin gibi küçük bir polar molekül ile birleşmiştir. Hücre zarlarının tek nongliserol fosfolipidi olan **sfingomyelin**, gliserol yerine serinden oluşan bir polar baş kısma bağlanmış iki hidrokarbon zinciri içerir. Tüm fosfolipidler, iki hidrokarbon zincirinden oluşan hidrofobik kuyruk bölümleri ile, fosfat grubu ve polar bağlantılarından oluşan polar baş kısım içerirler. Sonuç olarak fosfolipidler **amfipatik** moleküllerdir: kısmen suda çözünen, kısmen de suda çözünmeyen özelliğe sahiptirler. Bu bölümde daha sonra görüleceği gibi, fosfolipidlerin bu özellikleri, biyolojik zarların yapılanmalarının temellerini oluşturmaktadır.

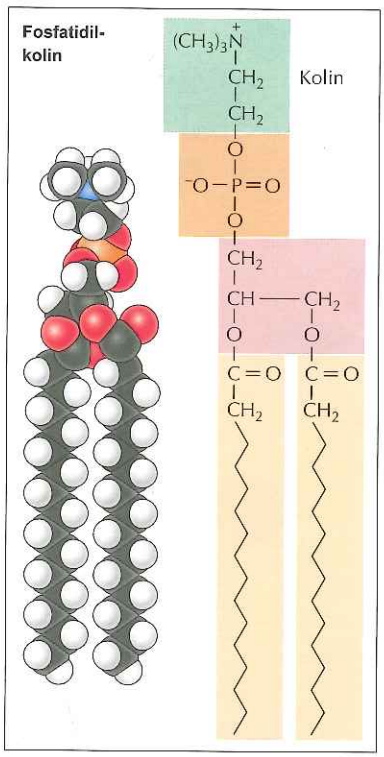
Fosfolipidlere ek olarak, birçok hücre zarı **glikolipid** ve **kolesterol** içerir. Glikolipidler karbohidrat içeren bir polar baş kısmına bağlanmış iki adet hidrokarbon zincirinden oluşmaktadır (Şekil 2.8). Bu yüzden amfipatik moleküller olarak genel kompozisyonları açısından fosfolipidlere benzerler. Buna karşın kolesterol doğrusal hidrokarbon zincirleri yerine dört adet karbohidrat halkasından oluşmaktadır (Şekil 2.9). Hidrokarbon halkalar kuvvetli hidrofobik

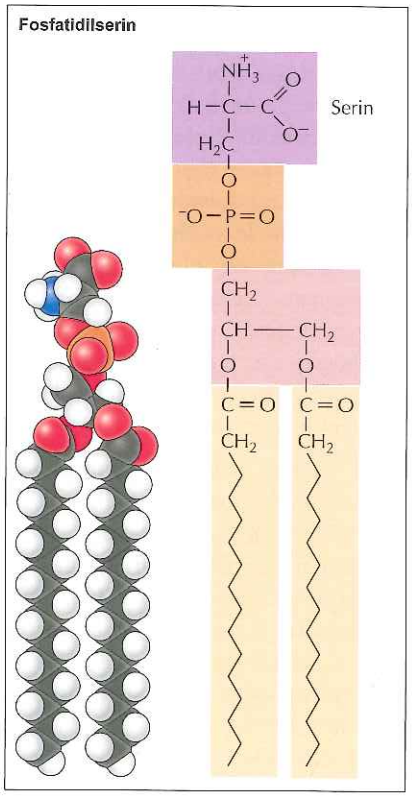


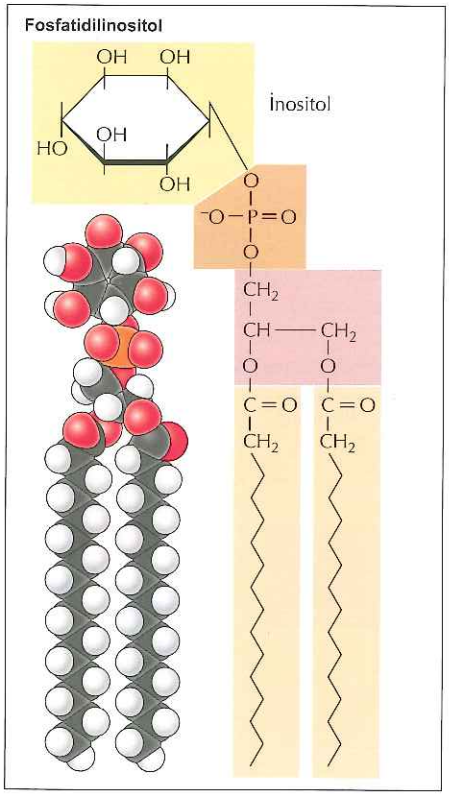
Şekil 2.9 Kolesterol ve steroid hormonlar Önemli bir hücre zar komponenti olan kolesterol, polar hidroksil grubu nedeniyle amfipatik bir moleküldür. Kolesterol aynı zamanda, testosteron ve östradiol (bir östrojen türü) gibi steroid hormonların öncülüdür. Bu şekilde, halka karbonlarına bağlı olan hidrojen atomları gösterilmemiştir.

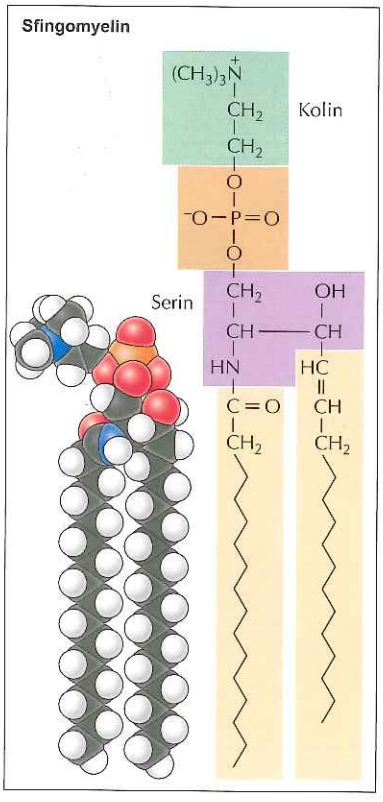

Fosfatidik asit
Fosfat
Gliserol


Fosfatidil-
etanol amin
Etanolamin


Fosfatidil-
kolin
Kolin

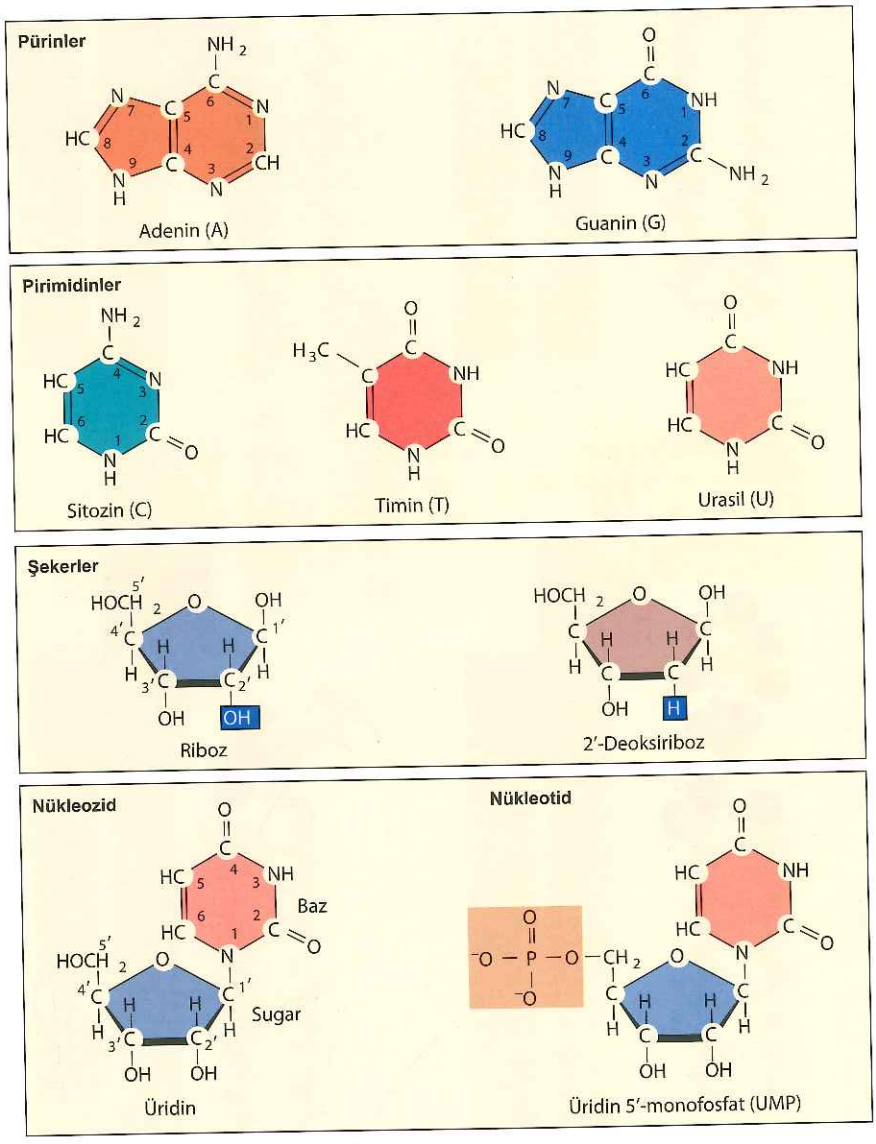

Fosfatidilserin
Serin


Fosfatidilinositol
İnositol


Sfingomyelin
Kolin
Serin

özelliktedir; ancak, kolesterolün bir ucuna bağlanmış olan hidroksil (OH) grubu zayıf hidrofil karakterdedir; bu yüzden, kolesterol amfipatiktir.

Lipidler, hücre zarlarının komponentleri olma rollerine ek olarak hem hücre içi, hem de hücreler arası sinyal molekülleri olarak da işlev görürler. **Steroid hormonlar** (östrojenler ve testosteron gibi) kolesterol türevleridir (bkz. Şekil 2.9). Bu hormonlar, belirli fonksiyonel grupların bağlandığı dört adet hidrokarbon halkası içeren, heterojen bir kimyasal haberci grubudur. Fosfolipidlerin türevleri de, hücre içinde, haberci moleküller olarak rol alırlar: hücre yüzeyi reseptörlerinden aldıkları sinyalleri, hücre proliferasyonu, hareketi, yaşamı ve diferansiyasyonu gibi geniş bir hücresel olay yelpazesini düzenleyen, hücre içi hedeflere iletirler (bkz. Bölüm 16).

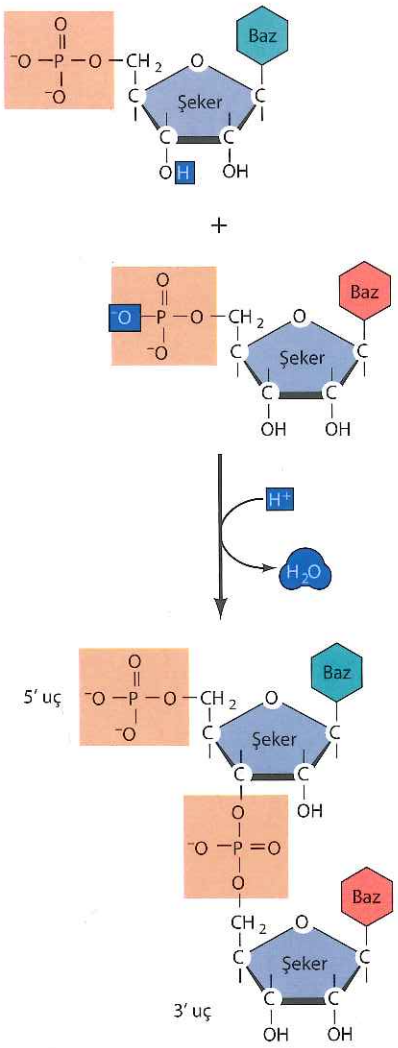


Şekil 2.10 Nükleik asitlerin bileşenleri Nükleik asitler, fosforillenmiş şekerlere bağlı pürin ve pirimidin bazlarını içerirler. Nükleozid, yalnızca şeker molekülüne bağlı olan nükleik asit bazından oluşmaktadır. Nükleotidler, ek olarak, bir ya da daha fazla fosfat grubu içerirler.

Nükleik asitler

Nükleik asitler—DNA ve RNA—hücrenin temel bilgi molekülleridir. **Deoksiribonükleik asit (DNA)**, ökaryotik hücrelerde nükleusta yerleşim gösteren genetik materyali oluşturma gibi özgün bir role sahiptir. Değişik **ribonükleik asit (RNA)** türleri de bir dizi hücresel etkinliğe katılmaktadır. **Mesajcı RNA (mRNA)** DNA'dan bilgiyi, protein sentezi için kalıp görevi yaptığı ribozomlara taşır. İki başka RNA türü (**ribozomal RNA** ve **transfer RNA**) protein sentezinde görevlidir. Başka RNA türleri de, hem RNA'ların, hem de proteinlerin işlemleme ve taşımasında rol alır. Bilgi molekülü olmasına ek olarak, RNA bazı kimyasal tepkimeleri katalizleme yeteneğine sahiptir. Bugünkü hücrelerde, bu, hem protein sentezi hem de RNA işlenmesindeki tepkimeleri kapsar.

DNA ve RNA, **nükleotid** polimerleridir; nükleotidler, fosforillenmiş şekerlere bağlı **pürin** ve **pirimidin** bazlarından oluşmaktadır (**Şekil 2.10**). DNA iki adet pürin (**adenin** ve **guanin**) ve iki adet pirimidin (**sitozin** ve **timin**) içerir. Adenin, guanin ve sitozin RNA'da da bulunmaktadır, ancak RNA, timin yerine **urasil** içerir. Bazlar şekerlere (DNA'da **2′-deoksiriboz**, ya da RNA'da, **riboz**) bağlanarak **nükleozidleri**



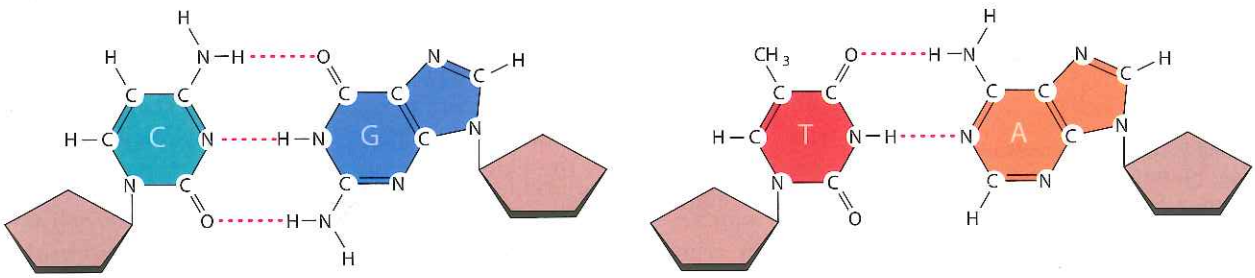
Şekil 2.11 Nükleotidlerin polimerleşmesi Nükleotitler 5′ ve 3′ hidroksil grupları arasında fosfodiester bağları ile birleşir. Bir nükleotid zincirinin 5′ ucu fosfat grubuyla sonlanırken, 3′ ucu hidroksil grubuyla sonlanır.

oluştururlar. Nükleotidler buna ek olarak, nükleozid şekerlerin 5′ karbonlarına bağlı bir ya da daha fazla fosfat grupları içerirler.

Nükleotidlerin nükleik asitleri oluşturmak üzere polimerleşmesi, bir nükleotidin 5′ fosfatı ile, diğerinin 3′ hidroksil grubu arasında **fosfodiester bağlarının** oluşumunu kapsar (**Şekil 2.11**). **Oligonükleotidler**, yalnızca birkaç nükleotid içeren küçük polimerlerdir; hücresel RNA ya da DNA'yı oluşturan büyük **polinükleotidler**, sırasıyla, binlerce ya da milyonlarca nükleotid içerirler. Kaydedilmesi gereken önemli bir nokta, polinükleotid zincirinin belirli bir yöne sahip olmasıdır; zincirin bir ucu 5′ fosfat grubu ile, diğer ucu da 3′ hidroksil grubu ile sonlanır. Polinükleotidler her zaman 5′-3′ yönde sentezlenirler; büyüyen zincirin 3′ OH grubuna serbest nükleotid eklenmektedir. Konvansiyonel olarak, DNA ya da RNA'da baz dizilimi 5′- 3′ yönünde belirtilir.

DNA ya da RNA'daki bilgi, polinükleotid zincirindeki bazların dizilimi ile iletilmektedir. DNA, iki polinükleotid zincirinin ters yönlerde sıralandığı çift-sarmal bir moleküldür (bkz. Bölüm 4). Bazlar molekülün iç kısmında yerleşim gösterir ve iki zincir tamamlayıcı baz çiftleri arasında oluşan hidrojen bağları ile birleşirler: adenin timin ile, guanin de sitozin ile eşleşir (**Şekil 2.12**). Bu tür tamamlayıcı baz eşleşmesinin önemli bir sonucu, bir DNA (ya da RNA) sarmalının tamamlayıcı bir sarmalın sentezini yönlendirmek için kalıp görevini üstlenebilmesidir. Böylece, nükleik asitlerin, kendi kendilerini kopyalamayı yönlendirmek gibi özgün rolleri vardır, bu da onların hücrenin temel bilgi molekülleri olarak fonksiyon görmesini sağlar. DNA ve RNA tarafından taşınan bilgi, hücresel etkinliklerinin çoğunluğunu kontrol eden spesifik proteinlerinin sentezini yönetir.

Nükleotidler, yalnızca nükleik asitlerin yapı taşı olarak önemli değillerdir; başka hücresel olaylarda da kritik roller üstlenirler. Belki de en önemli örnek, hücrenin kimyasal enerjisinin temel formu olan adenozin 5′-trifosfat (ATP) dır. Benzer olarak, diğer nükleotidler, ya enerjiyi, ya da reaktif kimyasal grupları geniş bir metabolik tepkime yelpazesi içinde taşıma görevini üstlenirler. Ayrıca,



Şekil 2.12 Nükleik asit bazları arasındaki tamamlayıcı eşleşme DNA'nın iki ipliği arasında hidrojen bağlarının oluşumu guanin'in (G) spesifik olarak sitozin (C) ile, adenin'in (A) ise spesifik olarak timin (T) ile eşleşmesine yol açar.

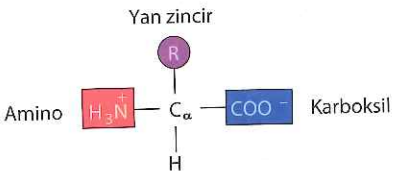
Bilgi İçin

Amino asitler, proteinlerin yapı taşlarını oluşturmalarının yanısıra, hücrelerin iletişimini sağlayan moleküller olarak da önemli biyolojik görev yapmaktadırlar. Glisin ve glutamat amino asiti, proteinlerde yer almayan birçok diğer amino asitle birlikte, nörotransmiter olarak görev alır (Bkz. Bölüm 16).

Bilgi İçin

Proteinler inanılmaz ölçüde çeşitlilik sergilerler. Bazı ender rastlanan proteinler şunlardır:

- Kaya midyeleri tarafından sualtındaki yüzeylere tutunmak amacıyla kullanılan yapıştırıcı proteinler. Bilim insanları, bu proteinleri, yapıştırıcı ya da antikorosif tabaka olarak endüstriyel amaçlı kullanmak için geliştirmeye çalışmaktalar.
- Altın Küre (*Golden Orb*) olarak adlandırılan bir örümcek türünün ipek proteini. Son derede hafif ve esnek olmasına rağmen, hemen hemen, kurşun geçirmez yeleklerin yapımında kullanılan "Kevlar" kadar güçlüdür.



Şekil 2.13 Amino asitlerin yapısı Her bir amino asit, merkezi bir karbon atomu (α karbon) ile bağlanmış bir adet hidrojen atomu, bir karboksil grubu, bir amino grubu ve de spesifik bir yan zincirden (R ile gösterilir) oluşur. Fizyolojik pH'da, gösterildiği gibi, hem karboksil, hem de amino grupları iyonize durumdadır.

bazı nükleotidler (örn., siklik AMP) hücrelerdeki önemli sinyal moleküllerdir (bkz. Bölüm 16).

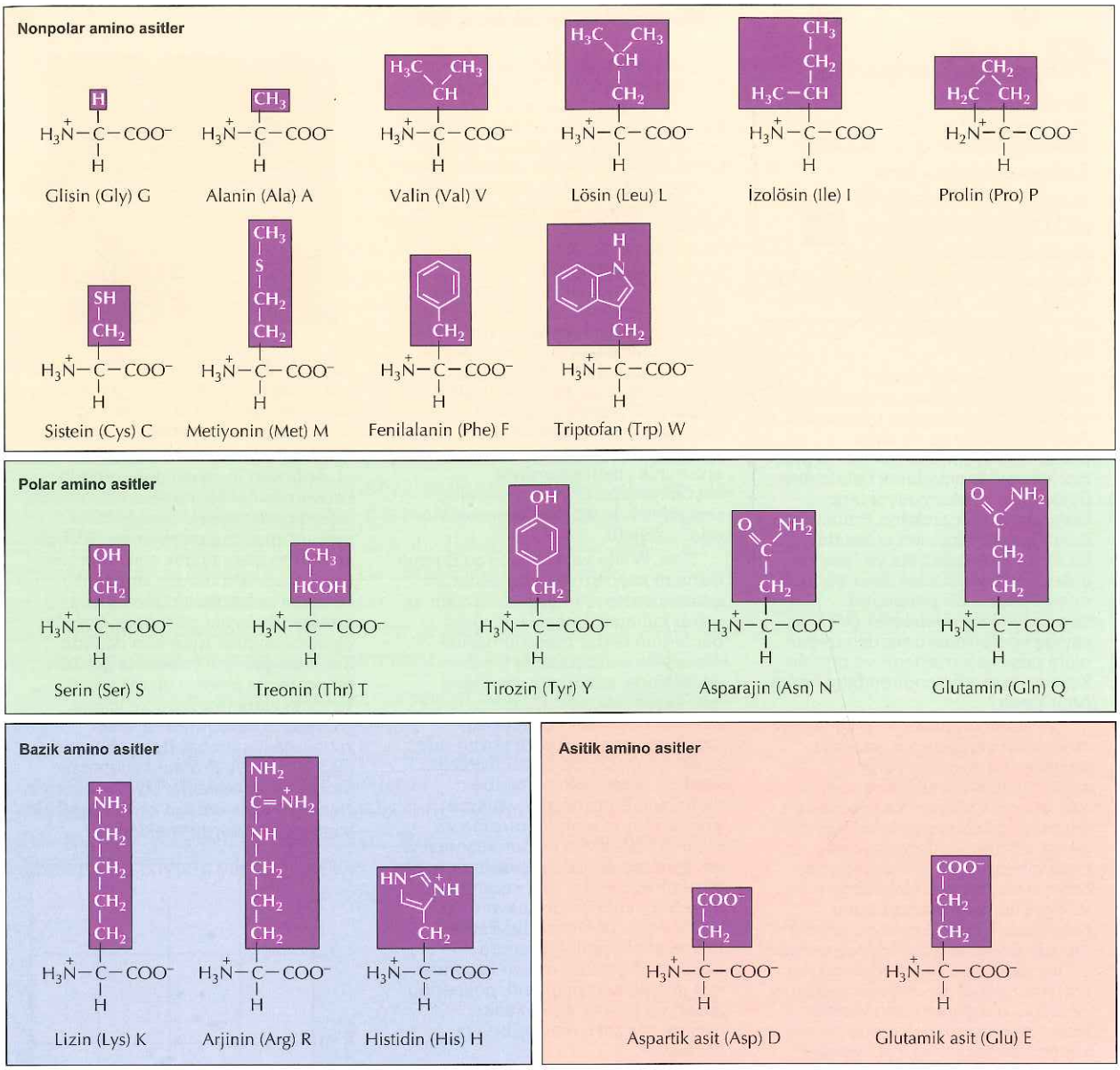
Proteinler

Nükleik asitler hücrede genetik bilgiyi taşırken, **proteinlerin** temel sorumlulukları, bu genetik bilgi ile yönlendirilen işlerin yerine getirilmesidir. Proteinler, tüm makromoleküller arasında en çok çeşitlilik gösterenlerdir ve her hücre, çok çeşitli görev yapan birkaç bin değişik protein içermektedir. Proteinlerin işlevleri, hücrelerin ve dokuların yapısal bileşenlerini oluşturmak, küçük moleküllerin taşıması ve depolanmasında görev almak (örn., hemoglobin tarafından oksijen taşınması), hücreler arasında bilgi iletmek (örn., protein hormonlar), enfeksiyona karşı koruma (örn., antikorlar) oluşturmaktır. Ancak, proteinlerin en temel özellikleri, enzim olarak görev yapmaları olup, bir sonraki başlıkta ele alındığı gibi biyolojik sistemlerdeki hemen tüm tepkimeleri katalizlemektir. Böylece, proteinlerin, hücrenin hemen tüm etkinliklerini yönettikleri söylenebilir. Biyolojik kimyada proteinlerin temel önemi adlarından anlaşılmaktadır: Yunanca'da *proteios*, "birinci sırada" anlamındadır.

Proteinler, 20 değişik **amino asitin** polimerleridir. Her bir amino asit, bir karbon atomu (α karbon olarak adlandırılır) ve bağlı olduğu bir karboksil grubu (COO^-), bir amino grubu (NH_3^+), bir hidrojen atomu ve belirli bir yan grup içermektedir (**Şekil 2.13**). Değişik amino asit yan gruplarının spesifik kimyasal özellikleri, her bir amino asitin proteinin yapı ve işlevindeki rolünü saptar. Amino asitler, yan gruplarının özelliklerine göre, dört geniş sınıf oluştururlar (**Şekil 2.14**). On amino asit, su ile etkileşime girmeyen non-polar yan zincirler içerirler. Glisin, yan grubu yalnızca bir hidrojen atomundan ibaret olan, en basit amino asitdir. Alanin, valin, lösin ve izolösinde, dört karbon atomuna kadar hidrokarbon zinciri bulunmaktadır. Bu amino asitlerin yan grupları hidrofobik olup, proteinlerin, su ile temas etmeyecekleri iç bölgelerinde yer alma eğilimindedirler. Benzer şekilde iki nonpolar amino asit, fenilalanin ve triptofan, kuvvetli hidrofobik aromatik halkalar içeren yan gruplara sahiptir. Prolin de benzer olarak bir hidrokarbon zinciri içerir; ancak, yan zinciri amino grubun azotuna ve de α karbona bağlı olup halkasal bir yapı oluşturan tek amino asit olma özelliğindedir. İki amino asit, sistein ve metiyonin, yan zincirleri kükürt atomu içermektedirler. Metiyonin oldukça hidrofobdur; ancak, sistein, sülfidril (SH) grubu nedeniyle, daha az hidrofobdur. Daha sonra tartışılacağı gibi, sisteinin sülfidril grubu değişik sistein birimlerinin yan grupları arasında disülfid bağları oluşabildiği için, protein yapısında önemli bir görev üstlenmektedir.

Beş adet amino asit yüksüz fakat polar yan zincirler içerirler. Bunlar, yan zincirlerinde hidroksil grupları içeren serin, treonin, tirozin ile, polar amid grupları [$O{=}C{-}NH_2$] içeren asparajin ve glutaminden oluşmaktadır. Bu amino asitlerin polar yan zincirleri su ile hidrojen bağı oluşturabildiklerinden, bu amino asitler hidrofilik özelliktedir ve proteinlerin dış yüzeylerinde yerleşim gösterme eğilimindedirler.

Lizin, arjinin ve histidin amino asitleri yüklü bazik yan zincirler içerirler. Lizin ve arjinin son derece bazik özellikte amino asitlerdir; ve de yan zincirleri hücre içinde pozitif olarak yüklüdür. Dolayısıyla, kuvvetli hidrofilik özellikte olup proteinlerin yüzeylerinde su ile temas halinde bulunurlar. Histidin, fizyolojik pH'da yüksüz ya da pozitif yüklü olarak bulunur; böylece, hidrojen



Şekil 2.14 Amino asitler Her bir amino asit için üç harfli ve bir harfli kısaltmalar gösterilmektedir. Amino asitler, yan zincirlerinin özelliklerine göre dört sınıfta toplanmıştır: nonpolar, polar, bazik ve asitik.

iyonlarının değişimini kapsayan enzimatik tepkimelerde, bir sonraki bölümde tartışılan enzimatik kataliz örneğinde görüleceği gibi, aktif rol oynarlar.

Son olarak, iki amino asit, aspartik asit ve glutamik asit, karboksil gruplarla sonlanan asitik yan zincirler taşırlar. Bu amino asitler hücre içinde negatif yüklü olup sıklıkla, aspartat ve glutamat olarak adlandırılırlar. Bazik amino asitler gibi, bunlar da kuvvetli hidrofiliktirler ve genellikle proteinlerin yüzeylerinde yerleşim gösterirler.

Video 2.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v2.1
Protein nedir? Tüm proteinler aynı yirmi amino asitin, değişik şekillerde birleşmesinden ve katlanmasından oluşur. Bu üç-boyutlu yapı (3-D) proteinin işlevi için kritik öneme sahiptir.

Anahtar Deney

Polipeptid Zincirlerinin Katlanması

Reductive Cleavage of Disulfide Bridges in Ribonuclease

Michael Sela, Frederick H. White Jr. and Christian B. Anfinsen
National Institutes of Health, Bethesda, MD
Science, Volume 125, 1957, pages 691-692

Bağlam

İşlevsel proteinler, yapısal olarak, amino asitlerin doğrusal zincirlerinden çok daha karmaşıktır. Aktif enzimlerin ya da diğer proteinlerin yapılanması, polipeptid zincirlerinin kesin olarak belirlenmiş üç-boyutlu konformasyonlara katlanmalarını gerektirir. Proteinler ile polipeptid zincirleri arasındaki bu farklılık protein yapı ve işlevinin anlaşılması yönünden kritik soruları ortaya çıkarır. Bir polipeptid tarafından kazanılabilecek çok sayıda konformasyonlardan uygun olanı nasıl seçilmektedir ve protein katlanmasını yönlendiren bilgi hangi özelliktedir?

Christian Anfinsen ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen klasik deneyler bu sorulara yanıt sağlamıştır. Ribonükleaz enzimini inceleyerek Anfinsen ve arkadaşları, denatüre proteinlerin, kendiliğinden, tekrar aktif bir konformasyona katlanabildiklerini göstermişlerdir. Dolayısıyla, bir proteinin doğru üç-boyutlu konformasyonunu belirleyecek olan tüm bilgi, proteinin birincil amino asit diziliminde saklıdır. Bu tür bir dizi deney, Anfinsen'i, bir proteinin doğal üç-boyutlu yapısının, kendisini oluşturan amino asitler tarafından saptanan termodinamik yönden en kararlı konformasyona karşılık geldiği sonucuna götürmüştür. Bu son derece önemli ilkenin formülasyonuna götüren deneyler, 1957 yılında Christian Anfinsen, Michael Sela ve Frederick White tarafından rapor edilmiştir.

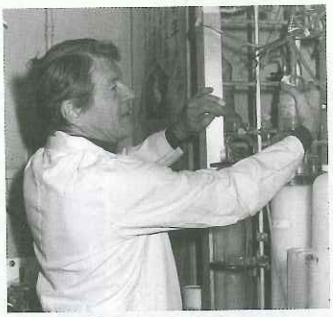
Deneyler

Sela, White ve Anfinsen tarafından üzerinde çalışılan protein, 124 amino asitlik, sistein birimlerinin yan zincirleri arasında dört disülfid (S–S) bağı içeren küçük bir protein olan bovin ribonükleazdır. Ribonükleazın aktivitesi RNA'yı nükleotidlere parçalanma kapasitesi olarak saptanır. Ribonükleaz aktivitesi, ribonükleazın hem non-kovalent bağlarının (hidrojen bağları) yıkıldığı, hem de disülfüd bağlarının sülfhidril (SH) gruplara indirgendiği işlemlerle tamamen kaybolur. Denatüre proteinin rastgele inaktif bir konformasyonda olduğu gözlemiştir. Enzimatik etkinlik, doğal enzimin arta kalan % etkinliği olarak ifade edilmiştir. Arasında dört adet disülfid bağı (S—S) bulunan sığır ribonükleaz'ı idi. Ribonükleazın enzimatik etkinliği RNA'nın nükleotidlerine yıkılımına dayanan ve doğal proteinin işlevinin ölçümü için uygun olan pratik bir yöntemle saptanabilmekteydi. Ribonükleaza, hem nonkovalent bağların (örn., hidrojen bağları) hem de disülfid bağlarının yıkılması (sülfidril gruplarına dönüştürmek suretiyle) ile sonuçlanan işlemler uygulandığında, enzimatik etkinlik tümüyle kaybolmuştur. Denatüre protein, rastgele bir inaktif konformasyona dönüşmüştür.

Sela, White ve Anfinsen şu önemli gözlemi kaydetmişlerdir: denatüre edilmiş protein, polipeptid zincirinin tekrar katlanabilmesi ve disülfid bağlarının tekrar oluşabilmesine olanak veren koşullarda inkübe edildiğinde, enzimatik etkinliğini geri kazanmaktadır. Bu deneylerde denatüran etkenler ortamdan uzaklaştırılmış ve inaktif enzim oda sıcaklığında O_2 içeren bir fizjolojik tampon çözelti içinde inkübe edilmiştir. Bu prosedür, sülfidril gruplarının yükseltgenmesine ve disülfid bağlarının tekrar oluşmasına yol açmıştır. Bu işlem sırasında enzim katalitik etkinliğini geri kazanmış olup bu, natif konformasyonuna katlandığını göstermiştir. Başka hücresel bileşenler ortamda bulunmadığından, uygun katlanma için gerekli tüm bilgilerin, polipeptid zincirinin primer amino asit diziliminde saklı olduğu ortaya çıkmıştır.

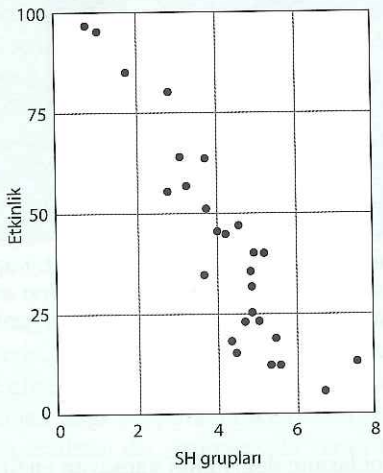
Etki

Denatüre edilmiş ribonükleazın doğal yapısını ve enzimatik etkinliğini tekrar kazandığı koşulları tanımlayan daha başka deneyler gerçekleştirilmiş ve protein katlanmasının "termodinamik hipotezini" oluşturulmuştur: bir proteinin doğal üç-boyutlu yapısı fizyolojik koşullarda termodinamik olarak en kararlı duruma karşılık gelmektedir. Termodinamik kararlılık, proteini oluşturan amino asitlerin etkileşimleri ile saptanmaktadır; dolayısıyla, proteinlerin üç-boyutlu konformasyonları doğrudan primer amino asit dizilimleri ile belirlenmektedir. DNA'daki nükleotidlerin sıralanması bir polipeptidin amino asit dizilimini belirlediğinden, bir genin nükleotid diziliminin protein ürününün üç-boyutlu yapısını saptayan tüm bilgiyi içerdiği sonucu çıkmıştır.

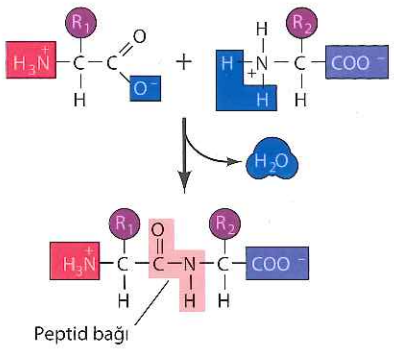


Christian B. Anfinsen

Anfinsen'in çalışmaları protein katlanmasının termodinamik temelini ortaya çıkarmışsa da, bu sürecin mekanizmasının anlaşılması aktif bir araştırma alanı olarak açıktır. Protein katlanması son derece karmaşıktır ve halen bir proteinin amino asit dizilimiden yola çıkarak üç-boyutlu yapısını bulmak mümkün değildir. Şunu da göz ardı etmemek gerekir: bir proteinin *in vitro* olarak kendi kendine katlanması hücre içinde, enzimlerin yardımıyla, protein katlanmasından çok daha yavaştır (bkz. Bölüm 9). Protein katlanması problemi bu nedenle, biyolojik kimya alanında, araştırmaya açık önemli bir konu olmayı sürdürmektedir.



Renatürasyon deneylerinin sonuçlarının özeti Grafikte y-ekseninde ribonükleazın enzimatik etkinliği, x-ekseninde değişik işlemler sonucunda saptanan sülfidril gruplarının sayısına göre grafik içine yerleştirilmiştir. Enzimatik etkinlik, doğal enzimin arta kalan % etkinliği olarak ifade edilmiştir.

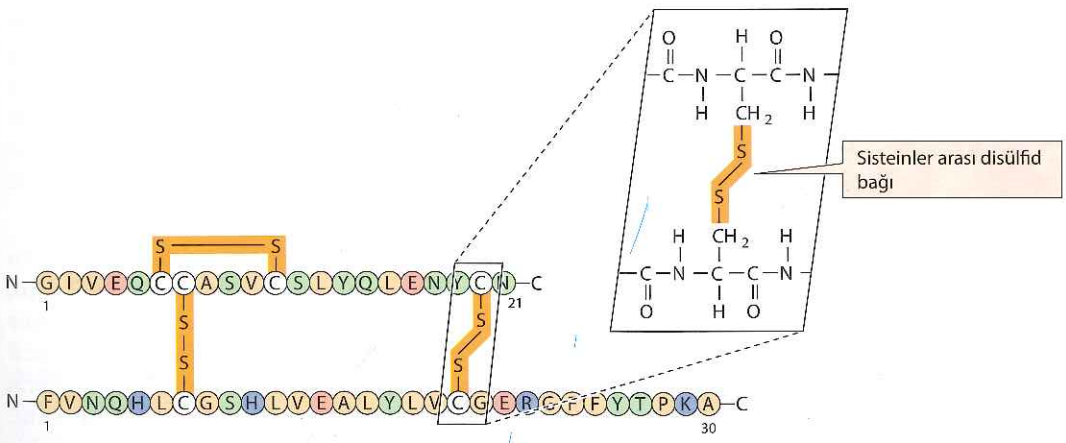


Şekil 2.15 Peptid bağının oluşumu Bir amino asitin karboksil grubu, ikincisinin amino grubuna bağlanmaktadır.

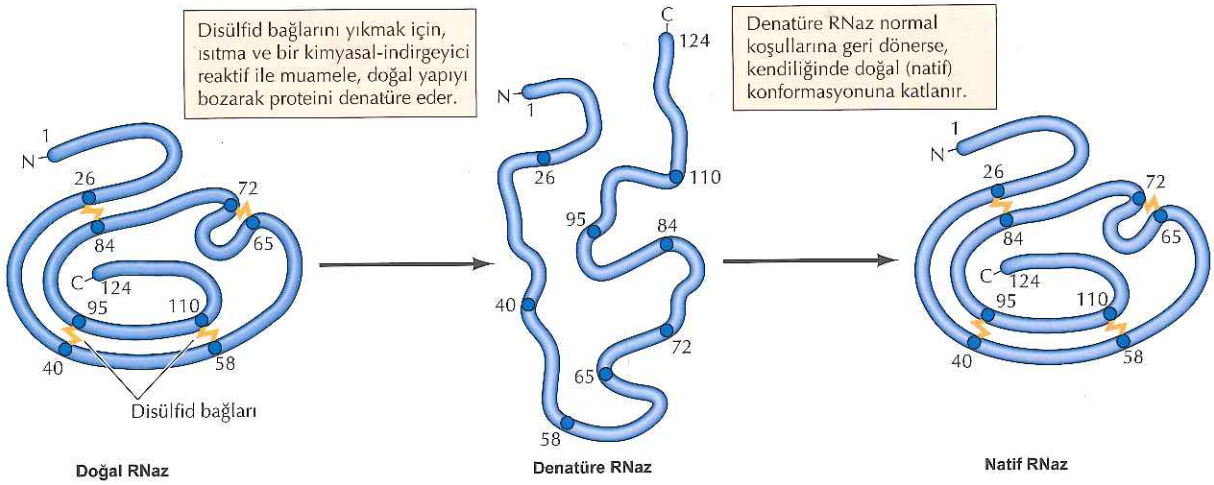
Amino asitler, bir amino asitin α amino grubu ile bir diğerinin α karboksil grubu arasında oluşan **peptid bağları** yoluyla birleşirler (**Şekil 2.15**). **Polipeptidler**, genelde yüzlerce ve hatta binlerce amino asitden oluşan doğrusal zincirlerdir. Her bir polipeptid zincirinin iki ayrı ucu bulunur: bir tanesi alfa amino grubu (amino, ya da N ucu), diğeri de karboksil grup (karboksil ya da C ucu) ile sonlanır. Polipeptidler, amino ucundan, karboksil ucuna doğru sentezlenirler ve polipeptiddeki amino asitlerin dizilimi (geleneksel olarak) aynı sıra ile belirtilir.

Proteinlerin tanımlayıcı özelliği, spesifik amino asitlerden oluşan polipeptidler olmalarıdır. Frederick Sanger, 1953'de ilk olarak bir proteinin, insülin hormonunun, tam amino asit dizilimini ortaya çıkarmıştır. İnsülinin, sistein birimleri arasında yer alan disülfid bağları ile birleşmiş iki adet polipeptid zincirinden oluştuğu bulunmuştur (**Şekil 2.16**). En önemlisi, Sanger'in deneyi: her bir proteinin, spesifik bir amino asit dizilimini içerdiğini göstermiştir. Günümüzde protein dizilimleri genellikle mRNA'ların diziliminden çıkarsama yapılarak aydınlatılmaktadır ve 100,000'in üzerinde proteinin amino asit dizilimi bulunmuş durumdadır. Her biri, bir gendeki nükleotidlerin sıralaması ile belirlenen, özgün bir amino asit diziliminden oluşmaktadır (bkz. Bölüm 4).

Bir proteinin amino asit dizilimi, yapısının sadece bir komponentini oluşturur. Amino asitlerin uzanan zincirleri yerine, proteinler, işlevleri için kritik olan, belirgin üç-boyutlu konformasyonlar almaktadırlar. Proteinlerin bu üç-boyutlu konformasyonları, kendilerini oluşturan amino asitlerin etkileşimleri ile şekillenir. Bu nedenle, proteinlerin şekilleri, içerdikleri amino asitlerle belirlendiği söylenebilir. Bu, ilk kez Christian Anfinsen'in proteinlerin üç-boyutlu yapılarının, ısıtmak gibi nonkovalent bağların yıkıldığı



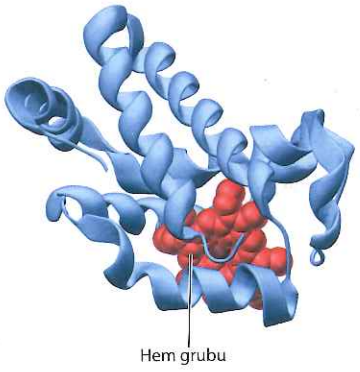
Şekil 2.16 İnsülin'in amino asit dizilimi İnsülin, biri 21, diğeri de 30 amino asitten oluşan (burada bir harfli kodlarıyla gösterilmiştir) iki polipeptid zinciri içermektedir. Üç çift sisteinin yan zinciri, ikisi polipeptid zincirlerini bağlayan, disülfid bağları ile birleşmiştir.



Şekil 2.17 Proteinlerin denatürasyon ve renatürasyonu Ribonükleaz (RNaz) 124 amino asit (sayılar ile gösterilmiştir) 'den oluşan bir proteindir. Normalde protein, doğal konfigürasyonunda, katlanmış durumda olup dört adet disülfid bağı (sistein kalıntıları eşleşmiş halkalar ile gösterilmiştir) içermektedir.

ve denatürasyon adı verilen işlemlerle bozulduğu deneyler ile gösterilmiştir (Şekil 2.17). Daha ılımlı koşullarda inkübasyon gerçekleştirildiğinde, denatüre olmuş bu proteinler, sıklıkla, spontan olarak renatürasyon ile doğal konformasyonlarına geri dönmüşlerdir. Bu da, bu konformasyonların doğrudan amino asit dizilimi ile belirlendiğini göstermektedir.

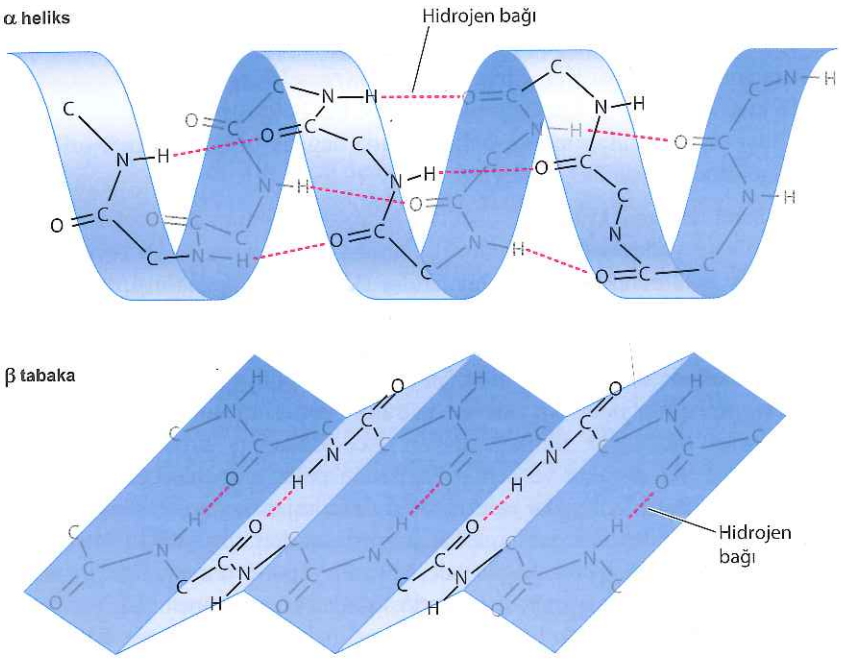
Proteinlerin üç-boyutlu yapıları, sıklıkla, yüksek çözünürlüğü olan ve bir moleküldeki her bir atomun yerleşimini saptayabilen **X-ışınları kristallografisi** tekniği ile analiz edilmektedir. Analiz edilecek olan proteinin kristallerine, bir X-ışınları demeti yönlendirilmekte ve protein kristalinden geçen X-ışınlarının paterni X-ışını filmi üzerinde saptanmaktadır. X-ışınları kristale çarptığında, moleküldeki atomların düzenine bağlı olarak karakteristik paternlerde saçılmaktadır. Dolayısıyla, molekülün yapısı saçılan X-ışınları (difraksiyon) paterninden elde edilebilmektedir.



Şekil 2.18 Miyoglobin'in üç-boyutlu yapısı Miyoglobin, oksijen bağlaması ile ilişkili olup 153 amino asitten oluşan bir proteindir. Polipeptid zinciri, oksijen bağlama yüzeyi olarak işlev gören bir hem grubu çevresinde katlanmıştır.

John Kendrew 1958'de bir proteinin, 153 amino asitlik göreceli basit bir protein olan miyoglobinin– üç-boyutlu yapısını saptayan ilk kişi olmuştur (Şekil 2.18). O tarihten itibaren birkaç bin proteinin üç-boyutlu yapısı incelenmiştir. Çoğunluğu, miyoglobin gibi, polipeptid zincirlerinin kompakt yapılara katlanmış olduğu globüler proteinler olup, bazıları da (bağ dokularının yapısal proteinleri gibi) uzun, lifsel moleküllerdir. Bu proteinlerin üç-boyutlu yapılarının kristallografi ile incelenmesi, proteinlerin yapılarındaki karmaşıklık nedeniyle, bir proteinin üç boyutlu yapısının amino asit diziliminden öngörülmesinin imkansız olduğunu, protein katlanmasında etken olan birçok temel ilkeyi ortaya çıkarmıştır.

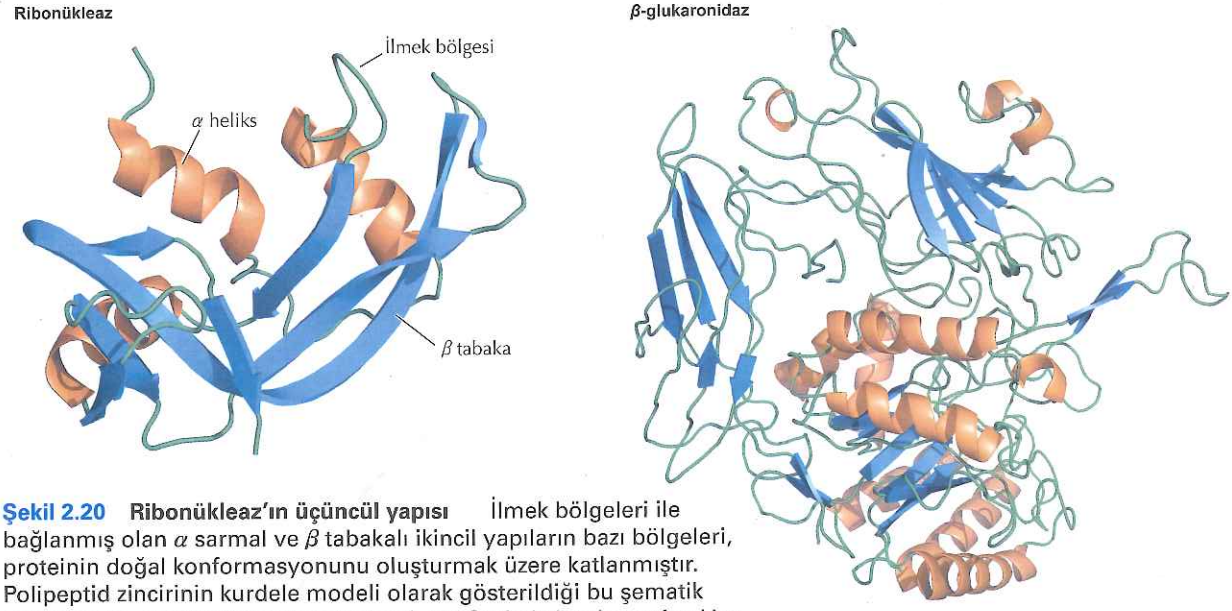
Protein yapısı genelde dört düzeyi olduğu tanımlanmıştır. Bir proteinin **birincil yapısı** polipeptid zincirindeki amino asitlerin dizilimidir. **İkincil yapı**, polipeptidin helikal bölgelerinde amino asitlerin düzenli yerleşimidir. Linus Pauling ve Robert Corey tarafından 1951'de ilk kez önerilen iki tip ikincil yapı, ***α* sarmal** ve ***β* tabakalı** yapıdır. Her iki ikincil yapı örneği, peptid bağlarının CO ve NH grupları arasındaki hidrojen bağları ile ayakta durur. *α* sarmal, polipeptid zincirinin bir bölgesi kendi çevresinde döndüğünde, bir peptid bağının CO grubu ile, doğrusal polipeptid zincirinde dört adet amino asit birimi uzaklığında diğer bir peptid bağının NH grubu arasında bir hidrojen bağının oluşumu ile şekillenmektedir (Şekil 2.19). Buna karşın, bir *β* tabakası,



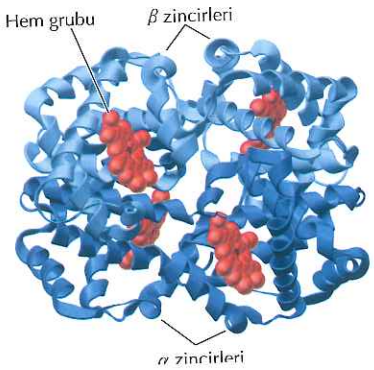
Şekil 2.19 Proteinlerin ikincil yapısı En sık rastlanan ikincil yapı örnekleri, α sarmal ve β tabakalı yapılardır. Bir α sarmalda, dört adet amino asit birimi uzaklığında yerleşim gösteren iki peptid bağının CO ve NH gruplan arasında hidrojen bağları kurulmaktadır. β tabakalı yapıda, hidrojen bağları, polipeptid zincirinin yan yana uzanan iki bölgesini birleştirmektedir. Amino asitlerin yan zincirleri gösterilmemiştir.

bir polipeptid zincirinin iki bölümü, aralarında hidrojen bağları ile, yan yana dizildiğinde şekillenmektedir. Bu tür β tabakalar, birbirine paralel ya da antiparalel olarak dizilen çok sayıda polipeptid zincirleri arasında da oluşabilir.

Üçüncül yapı, polipeptidin primer yapısının değişik bölgelerindeki amino asitlerin yan zincirlerinin birbirleri ile etkileşimi sonucunda (Şekil 2.20) katlanması ile oluşur. Proteinlerin çoğunluğunda, "ilmek" bölgesinde birleşen



Şekil 2.20 Ribonükleaz'ın üçüncül yapısı İlmek bölgeleri ile bağlanmış olan α sarmal ve β tabakalı ikincil yapıların bazı bölgeleri, proteinin doğal konformasyonunu oluşturmak üzere katlanmıştır. Polipeptid zincirinin kurdele modeli olarak gösterildiği bu şematik gösterimde, α sarmallar helezon olarak, ve β tabakalar da geniş oklar olarak simgelenmiştir. Ribonükleaz ve glukuronidaz sırasıyla bir ve üç bölgeli protein örnekleridir.



Şekil 2.21 Hemoglobin'in kuarterner yapısı Hemoglobin, her biri bir hem grubuna bağlı dört adet polipeptid zincirinden oluşmuştur. İki α zincir ile iki β zincir idantiktir.

α sarmal ve β tabakalı yapılarının değişik kombinasyonları **bölge** (***domain***) adı verilen kompakt globüler yapılara katlanırlar ki bu bölgeler, genellikle 50-200 arasında amino asit içeren tersiyer yapının temel birimleridir. Ribonükleaz ya da miyoglobin gibi küçük proteinler tek bir bölge içerirler; daha büyük proteinler örn. β Glukuronidaz, belirli sayıda değişik bölgeler içerebilirler ve bu bölgelerin sıklıkla farklı işlevleri vardır.

Üçüncül yapının kritik bir özelliği, hidrofobik amino asitlerin proteinin iç bölümünde yerleşmeleri ve hidrofilik amino asitlerin de, su ile etkileşimde olan yüzey bölümünde lokalize olmalarıdır. Dolayısıyla, katlanmış proteinlerin iç bölümleri temel olarak, α sarmal ve β tabakasal yapı gösteren hidrofibik amino asitlerden oluşmaktadır; bu sekonder yapıların proteinlerin hidrofobik kor bölümlerinde bulunmaları, hidrojen bağlarının, polipeptid omurgasının CO ve NH gruplarının polar karakterini nötralize etmesindendir. İkincil yapının elemanlarını birleştiren ilmik bölgeleri ise, katlanmış proteinlerin yüzey bölümlerinde yer almakta ve peptid bağlarının polar bileşenleri, su ile ya da hidrofilik amino asitlerin polar yan zincirleri ile hidrojen bağları oluşturmaktadır. Proteinin yüzeyinde, polar amino asitlerin yan zincirleri arasındaki etkileşimler (hidrojen bağları ve iyonik bağlar) de üçüncül yapının önemli belirleyicileri arasındadır. Bunlara ek olarak, sisteinlerin sülfidril grupları arasındaki kovalent disülfid bağları da, birçok hücre-yüzeyi veya salgılanan proteinin katlanmış yapılarını stabilize ederler.

Protein yapısının dördüncü düzeyi, **kuarterner yapı**, birden fazla polipeptid zincirinden oluşmuş proteinlerde değişik polipeptid zincirleri arasındaki etkileşimlerle şekillenir. Örneğin, hemoglobin, üçüncül yapısını oluşturanlar ile aynı türde etkilişimlerle bir arada tutulan dört adet polipeptid zincirinden oluşmaktadır (**Şekil 2.21**).

Yirmi değişik amino asitin özgün kimyasal özellikleri katlanmış proteinlerin üç-boyutlu yapılarında önemli ölçüde çeşitliliğe yol açmaktadır. Dolayısıyla, proteinler, hücrede biyolojisinde gerçekleştirdikleri geniş işlev yelpazesine uygun olarak, son derece karmaşık ve çeşitli bir makromolekül grubunu oluşturmaktadır.

Bilgi İçin

Enzimler, önemli katalizörlerdir. Bazı enzimler, bir reaksiyonun hızını, katalizlenmemiş bir reaksiyona oranla, 10^{18} kat kadar arttırabilirler; böylece, normalde milyarlarca yıl sürebilecek olan bir proses saniyeden daha kısa bir sürede gerçekleşebilir.

Biyolojik Katalizörler Olarak Enzimler

Proteinlerin temel bir görevi, enzim olarak işlev yapmaktır—enzimler, hücrelerdeki hemen tüm kimyasal reaksiyonların hızını artırırlar. Her nekadar RNA'lar bazı reaksiyonları katalizleme yeteneğine sahiplerse de, biyolojik reaksiyonların çoğunluğu proteinler tarafından katalizlenirler. Enzimatik kataliz yokluğunda, biyokimyasal reaksiyonların çoğu o kadar yavaş işler ki, yaşam ile bağdaşan sıcaklık ve basınç koşullarında gerçekleşmeleri olanaksızdır. Enzimler reaksiyonların hızlarını milyon katından daha fazla hızlandırırlar; kataliz yokluğunda yıllar sürecek reaksiyonlar, uygun enzim ile katalizlendiğinde, saniyenin fraksiyonları içinde gerçekleşebilir. Hücreler binlerce değişik enzim içerirler ve enzimlerin etkinlikleri, hücre içindeki birçok reaksiyondan hangilerinin gerçekleşeceğini belirler.

Animasyon 2.2
sites.sinauer.com/cooper7e/a2.2
Katalizörler ve Aktivasyon Enerjisi Kimyasal bir reaksiyonda enzim, geçiş durumuna ulaşmak için gereken enerji miktarını düşürerek, reaksiyonun yüksek bir hızda gerçekleşmesine olanak verir.

Enzimlerin katalitik aktiviteleri

Tüm diğer katalizörlerde olduğu gibi, **enzimler** de iki temel özellik gösterirler. Birincisi, kimyasal reaksiyonların hızını, kendileri tüketilmeden ya da kalıcı bir değişikliğe uğramadan arttırırlar. İkincisi, reaksiyon hızlarını, reaktantlar ve ürünler arasındaki kimyasal dengeyi değiştirmeksizin artırırlar.

Enzimatik katalizin bu ilkeleri aşağıdaki örnekte sergilenmektedir: **substrat** [S], olarak tanımlanan bir molekül, reaksiyon sonucunda, **ürüne** [Ü] dönüştürülmektedir. Enzimin yokluğunda reaksiyon aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$S \rightleftharpoons Ü$$

S ile Ü arasındaki kimyasal denge termodinamik yasalara göre saptanır (bu bölümde daha ilerki bir alt başlıkta tartışılacaktır) ve de, ileri ve geri reaksiyon hızlarının oranı ile temsil edilir (Sırasıyla, S→Ü ve Ü→S). Uygun enzimin varlığında, S'ın Ü'e dönüşümü hızlandırılır, ancak S ve Ü arasındaki denge değişmez. Bu nedenle, enzim, hem ileriye, hem de geriye doğru eşit olarak hızlandırmalıdır. Reaksiyon, aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$S \overset{E}{\rightleftharpoons} Ü$$

Enzimin (E) reaksiyonla değişime uğramadığına, böylece, S ve Ü'nün termodinamik özellikleri ile saptanan dengenin değişmediğine dikkat ediniz.

Böyle bir reaksiyona enzimin etkisi, S'ın Ü'e dönüşümü (**Şekil 2.22**) sırasında oluşması gereken enerji değişiklikleri ile, en iyi şekilde, gösterilebilir. Reaksiyonun dengesi, S ve Ü'nün, enzimatik kataliz ile değişmeyen, son enerji durumları ile saptanmaktadır. Ancak, reaksiyonun ilerlemesi için, substrat önce, **transisyon (geçiş) durumu** adı verilen daha yüksek bir enerji durumuna dönüştürülmelidir. Transisyon durumuna geçiş için gerekli enerji **(aktivasyon enerjisi)** reaksiyon ilerlemesine bir bariyer oluşturarak, reaksiyon hızını sınırlandırır. Enzimler (ve diğer katalizörler) aktivasyon enerjisini düşürerek ve böylece reaksiyonun hızını artırarak etki ederler. Artmış hız, hem ileri, hem de geri reaksiyonlarda aynıdır, zira her ikisi de aynı geçiş durumundan geçmek zorundadır.

Enzimlerin katalitik etkinlikleri, substratlarının, enzim-substrat kompleksi (ES) oluşturmak üzere bağlanmalarını içerir. Substrat, enzimin, **aktif bölge** olarak tanımlanan özgün bir bölgesine bağlanır. Aktif bölgeye bağlı durumda iken, substrat, reaksiyon ürününe dönüştürülerek enzimden serbestleştirilir. Enzim ile katalizlenen bir reaksiyon aşağıdaki şekilde yazılabilir:

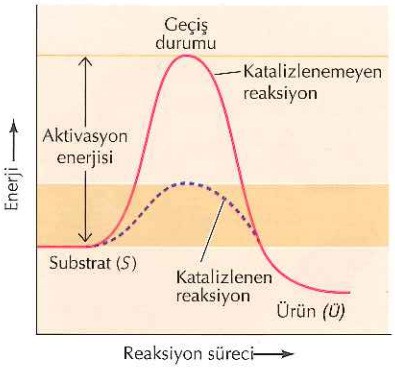
$$S + E \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + Ü$$

Denklemin her iki tarafında da E'nin değişmediğine ve dolayısıyla dengenin etkilenmediğine dikkat ediniz. Ancak, enzim, S'ı Ü'e dönüştüren reaksiyonların rahatça oluşabileceği bir yüzey sağlamaktadır. Bu, enzim ile substrat arasındaki, aktivasyon enerjisini düşüren ve geçiş durumunu destekleyen etkileşimlerin sonucudur.

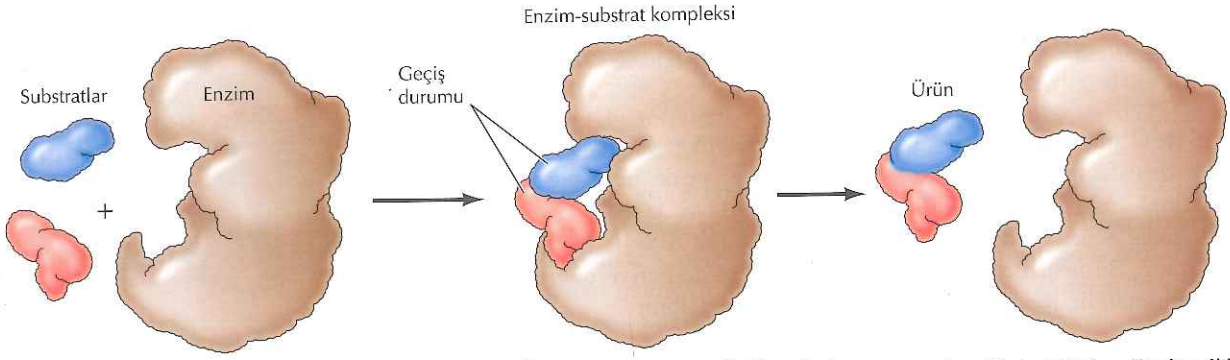
Enzimatik kataliz mekanizmaları

Bir substratın enzimin aktif bölgesine bağlanması çok spesifik bir etkileşimdir. Aktif bölgeler, enzimlerin yüzeyinde, genelde, katlanmış proteinin üçüncül yapısında bir arada tutulan değişik bölgelerin amino asitlerinden oluşan yarık ya da oluklardır. Substratlar, önce, aktif bölgeye, hidrojen bağları, iyonik bağlar ve hidrofobik etkileşimler gibi nonkovalent etkileşimlerle bağlanırlar. Substrat enzimin aktif bölgesine bağlandıktan sonra, reaksiyon ürününe dönüşümü çok sayıda mekanizma hızlandırabilir.

Her ne kadar bir önceki alt-başlıkta tartışılan basit örnek tek bir substrat molekülünü kapsıyor olsa da, biyokimyasal reaksiyonların çoğunluğunda, iki ya da daha fazla substrat arasındaki etkilişimler söz konusudur. Örneğin,



Şekil 2.22 Katalizlenen ve katalizlenmeyen reaksiyonlar Gösterilen reaksiyon, S substratının Ü ürününe basitçe dönüşümüdür. Ü'nün son enerji durumu S'ınkinden daha düşük olduğundan, reaksiyon soldan sağa doğru ilerler. Ancak, reaksiyonun oluşabilmesi için, S'ın öncelikle daha yüksek enerjili bir geçiş durumundan geçmesi gerekmektedir. Bu geçiş durumuna erişmek için gereken enerji (aktivasyon enerjisi) reaksiyonun ilerlemesine bir bariyer oluşturur ve dolayısıyla reaksiyonun ilerleme hızını saptar. Katalizör varlığında (örn., bir enzim) aktivasyon enerjisi düşürülmekte ve reaksiyon artmış hızda ilerlemektedir.



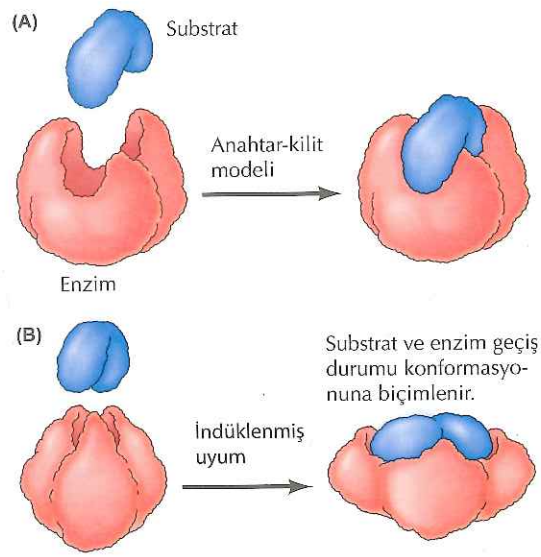
Şekil 2.23 İki substrat arasındaki reaksiyonun enzimatik katalizi Enzim, iki substratın uygun pozisyonda ve yönde bir araya getirileceği bir kalıp sağlamaktadır.

Animasyon 2.3
sites.sinauer.com/cooper7e/a2.3
Enzimle Katalizlenen Reaksiyonlar Bu örnekte, bir enzim iki substratı bir araya getirerek birbirleri ile tepkimelerini kolaylaştırır.

bir peptid bağın oluşumu iki amino asitin birleşmesini gerektirir. Bu tür reaksiyonlarda, iki ya da daha fazla substratın aktif bölgeye, uygun pozisyonda ve yönde bağlanması, reaksiyonu hızlandırır (Şekil 2.23). Enzim, reaktantların bir araya getirildiği ve reaksiyona girdikleri geçiş durumuna uygun, tercih edilen forma yönlendirildiği bir kalıp sağlamaktadır.

Enzimler aynı zamanda substratlarının konformasyonlarını, geçiş durumuna yaklaştırmak açısından, değiştirerek de reaksiyonları hızlandırabilirler. Enzim substrat birleşmesinde en basit model, **anahtar-kilit modeli** olup, bu durumda substratlar aktif yüzeye tam olarak uyarlar (Şekil 2.24A). Ancak, birçok durumda, hem enzimin, hem de substratın konfigürasyonları substratın bağlanması ile değişir—bu olaya **indüklenmiş uyum** (Şekil 2.24B) adı verilir. Bu gibi durumlarda, substratın konformasyonu geçiş fazına daha çok benzeyecek şekilde değiştirilmektedir. Substratın bu şekilde bozulmasından doğan stres, kritik bağları zayıflatmak suretiyle, geçiş fazındaki haline dönüşümünü kolaylaştırabilir. Ayrıca, geçiş durumu, substratın enzime sıkıca bağlanması ile stabilize olmakta ve böylece, gereken aktivasyon enerjisi düşürülmektedir.

Çok sayıda substratı bir araya getirmek ve substratların konformasyonlarını, geçiş durumuna yaklaştırmak üzere değiştirmenin yanı sıra, birçok enzim katalitik sürece doğrudan katılır. Bu durumda, aktif yüzeydeki spesifik amino asitler substrat ile reaksiyona girerek reaksiyon ara ürünleri arasında bağlar oluşturabilir. Bu katalitik mekanizmalarda, aşağıda



Şekil 2.24 Enzim-substrat etkileşimi modelleri (A) Anahtar-kilit modelinde, substrat, enzimin aktif yüzeyine tam olarak uymaktadır. (B) İndüklenmiş uyum modelinde, substratın bağlanması ile hem enzimin hem de substratın konformasyonları değişmektedir. Bu değişiklik, substratı geçiş durumundaki konformasyonundaki yaklaştırmakta ve böylece reaksiyonu hızlandırmaktadır.

enzimatik kataliz örneği olarak tartışılan kimotripsinde olduğu gibi, genellikle asitik ve bazik amino asitler yer almaktadır.

Kimotripsin proteinleri peptid bağlarının hidrolizini kataliz ederek sindiren enzim ailesinin (serin proteazlar) bir üyesidir. Reaksiyon aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$\text{Protein} + H_2O \rightarrow \text{Peptid}_1 + \text{peptid}_2$$

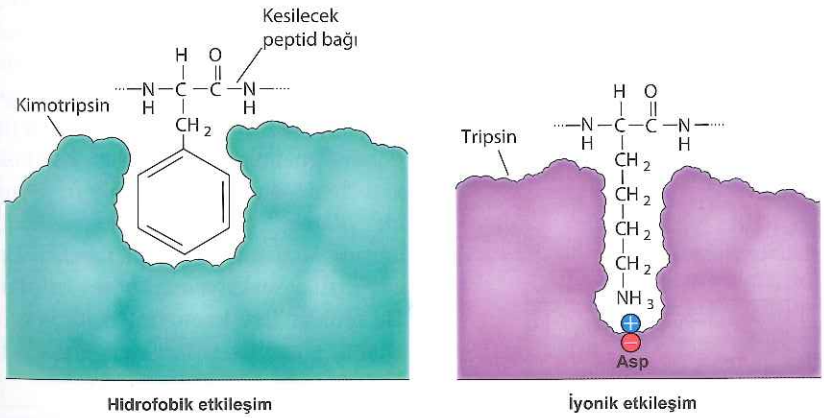
Serin proteazlar ailesinin değişik üyeleri (kimotripsin, tripsin, elastaz ve trombin dahil olmak üzere) farklı substrat özgüllüğüne sahiptirler; belirli amino asitlere komşu olan peptid bağlarını yıkılıma uğratırlar. Örneğin, kimotripsin, triptofan ve fenilalanin gibi hidrofobik amino asitlere komşu olan bağları sindirirken, tripsin, lizin ve arjinin gibi bazik amino asitlere komşu olan bağları sindirmektedir. Tüm serin proteazlar yapı olarak benzer olup aynı kataliz mekanizmasını kullanırlar. Bu enzimlerin aktif yüzeyleri, peptid bağın hidrolizini sürükleyen üç kritik amino asit içerir—serin, histidin ve aspartat. Bu enzimlere "serin proteazlar" denmesinin nedeni, serin amino asitlerinin merkezi rolüdür.

Substratlar, serin proteazlara, yıkılım bölgelerine komşu olan amino asitin enzimin aktif yüzeyindeki cebe girmesi ile bağlanırlar (**Şekil 2.25**). Bu cebin doğası serin proteaz ailesinin değişik üyelerinin substrat özgüllüklerini saptar. Örneğin, kimotripsinin bağlama cebi, tercih ettiği substratlarının hidrofobik yan zincirleri ile etkileşime girebilecek olan hidrofobik amino asitleri kapsar. Buna karşın, tripsinin bağlama cebinde, substratlarının lizin ya da arjinin amino asitleri ile iyonik bağ oluşturabilecek olan negatif yüklü asitik bir amino asit (aspartat) yer alır.

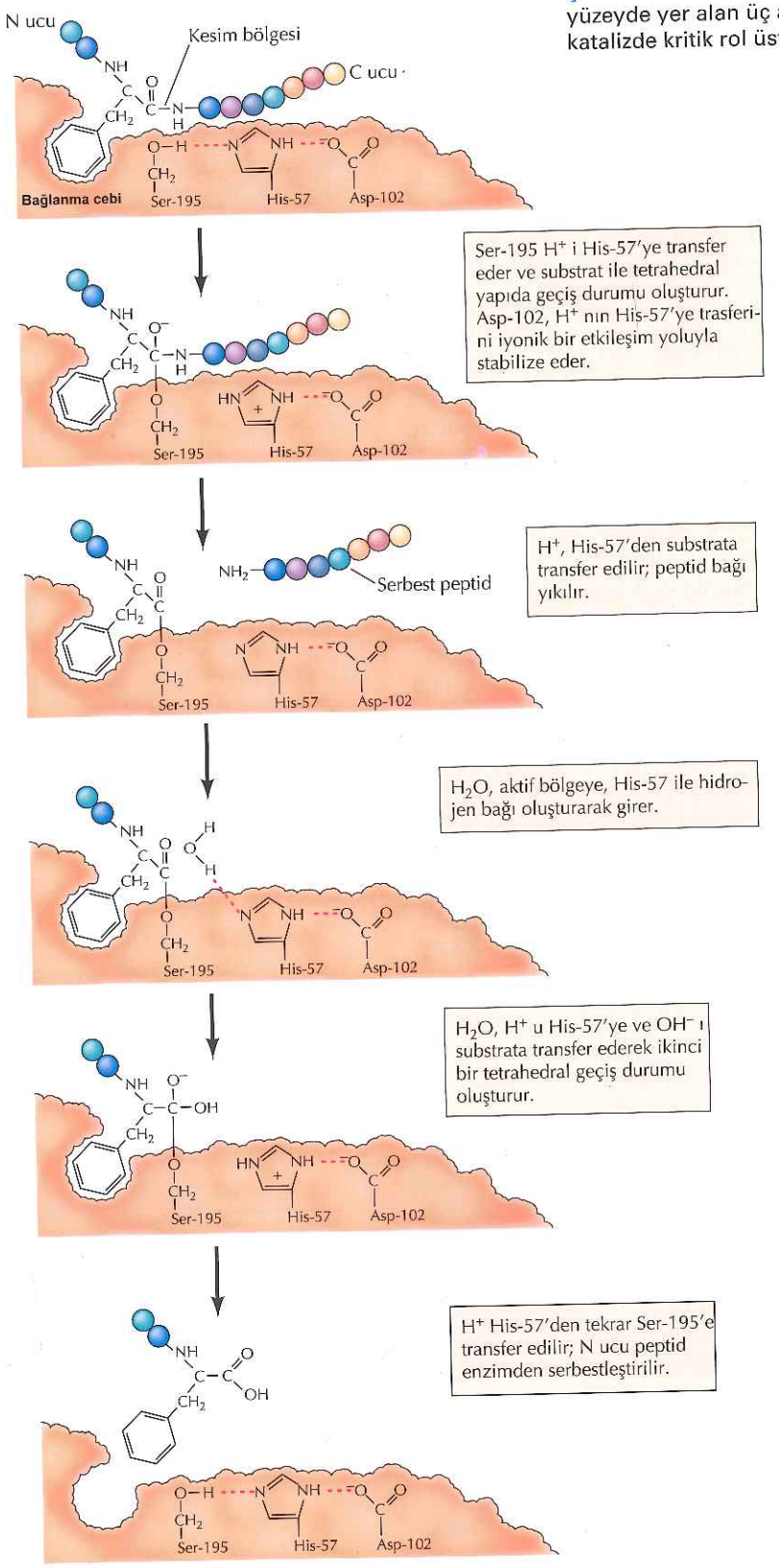
Substrat bağlanması, yıkıma uğratılacak olan peptid bağını aktif yüzeydeki serin amino asitine komşu pozisyonda yerleştirir (**Şekil 2.26**). Daha sonra, serinin protonu aktif yüzeydeki histidine transfer edilir. Aktif yüzeyin konformasyonu, bu transferi destekler niteliktedir çünkü histidin, negatif yüklü aspartat ile etkileşime girmektedir. Serin, substratla reaksiyona girerek tetrahedral bir geçiş durumu oluşturur. Daha sonra, peptid bağı yıkılır ve

Bilgi İçin

Proteazlar, hücrelerde ve virüslerde değişik roller oynayabilirler. Bazı HIV proteinleri, öncül moleküller olarak sentezlenerek, enfeksiyöz viral partikülleri oluşturmak üzere viral bir proteaz tarafından kesilmelidirler. Proteazın inhibisyonu HIV'in replikasyonunu bloke eder ve AIDS tedavisinde proteaz inhibitörü olarak tasarlanmış ilaçlar kullanılmaktadır. (Bkz. Bölüm 9.)



Şekil 2.25 Serin proteazlar tarafından substrat bağlanması Yıkılacak peptid bağına komşu olan amino asit enzimin aktif yüzeyinde bulunan bir cebe yerleştirilir. Kimotripsinde bu cep hidrofobik amino asitleri bağlamaktadır; tripsinin bağlama cebi ise, iyonik etkileşimlerle bazik amino asitleri bağlayan negatif yüklü aspartatları içermektedir.



Şekil 2.26 Kimotripsinin katalitik mekanizması Aktif yüzeyde yer alan üç amino asit (Ser-195, His57 ve Asp-102) katalizde kritik rol üstlenirler.

substratın C-ucu enzimden ayrılır. Ancak, N-ucu serine bağlı olarak kalır. Bu durum, bir su molekülünün (ikinci substrat) aktif yüzeye girerek önceki reaksiyonları tersine çevirmesi ile çözümlenir. Su molekülünün protonu histidine taşınır; peptid enzimden serbestleştirilir ve reaksiyon sonlanır.

Bu örnek, enzimatik katalizin birçok yönünü sergilemektedir: enzim-substrat reaksiyonlarının özgüllüğü, değişik substrat moleküllerinin aktif bölgeye yerleşimi, geçiş durumunun oluşmasında ve stabilizasyonunda, aktif-bölgedeki amino asitlerin rolü. Her ne kadar hücrelerde binlerce enzim çok değişik türde kimyasal reaksiyon katalizliyorsa da, aynı temel ilkeler bunların işleyişinde de uygulanabilir.

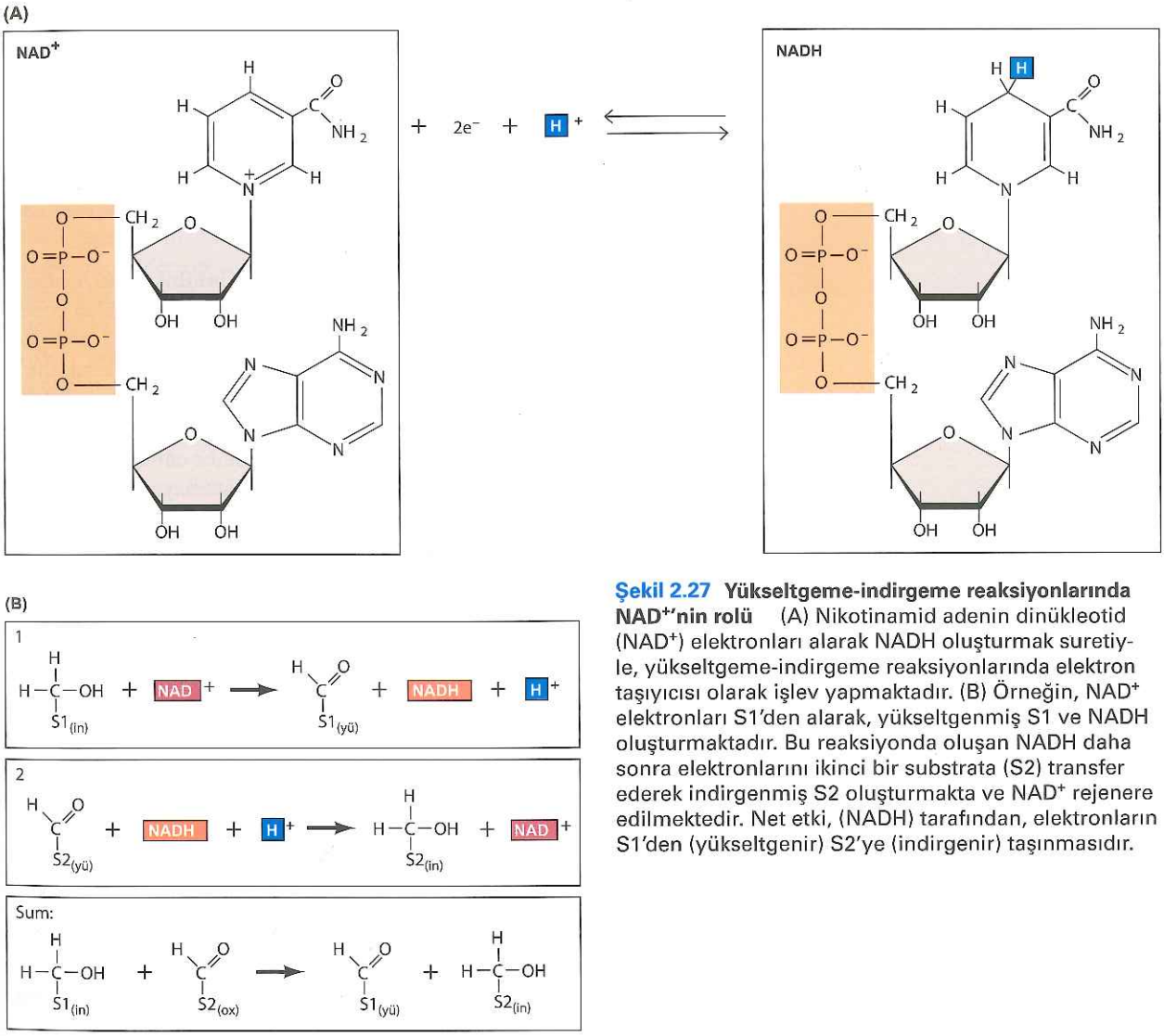
Koenzimler

Enzimlerin aktif bölgeleri, substratlarını bağlamalarının yanı sıra, katalize katılan başka küçük molekülleri de bağlarlar. **Prostetik gruplar**, proteinlere bağlı olup kritik fonksiyonel roller üstlenen küçük moleküllerdir. Örneğin, miyoglobin ve hemoglobin tarafından taşınan oksijen, bu proteinlerin prostetik grubu olan heme bağlanır. Birçok durumlarda metal iyonları (çinko ya da demir) enzimlere bağlı olup katalitik süreçlerde önemli role sahiptir. Buna ek olarak, birçok düşük molekül ağırlıklı organik moleküller belirli tip enzimatik reaksiyonda görev alırlar. Bu moleküllere **koenzimler** adı verilir çünkü enzimlerle birlikte, reaksiyon hızlarını artırmak için çalışırlar.

Substratlardan farklı olarak, koenzimler girdikleri reaksiyonlarda dönüşümsüz olarak değişime uğramayıp, birçok reaksiyona katılmak üzere tekrar kullanılırlar.

Koenzimler, birçok farklı tipte kimyasal grubun taşıyıcısı olarak görev yaparlar. Koenzimlere çok rastlanan bir örnek **nikotinamid adenin dinükleotid** (**NAD$^+$**) olup, yükseltgenme—indirgeme reaksiyonlarında elektron taşıyıcıları olarak görev alır (**Şekil 2.27**). NAD$^+$, bir substrattan bir hidrojen iyonu (H^+) ile iki adet elektron (e^-) alarak, NADH'ı oluşturur. NADH ise, bu elektronları ikinci bir substrata aktararak tekrar NAD$^+$ oluşturur. Böylece, NAD$^+$ elektronları bir substrattan (yükseltgenir) diğerine (indirgenir) taşımaktadır.

Birçok diğer koenzimler de elektron taşıyıcıları olarak davranırlar; bazıları da çok çeşitli başka kimyasal grupların transferi ile ilişkilidir (örn., karboksil ve açil grupları; **Tablo 2.1**). Aynı koenzimler, çeşitli enzimlerle birlikte işlev görerek spesifik kimyasal grupların geniş bir substrat yelpazesi içinde transferini katalizlerler. Birçok koenzimler, vitaminlerle sıkıca ilişkilidir; vitaminler koenzim yapısının bir kısmını ya da tümünü sağlarlar. Vitaminlere, *E. coli* gibi bakteriler gereksinim duymazlar ancak, bu bileşikleri sentez



Şekil 2.27 Yükseltgeme-indirgeme reaksiyonlarında NAD$^+$'nin rolü (A) Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD$^+$) elektronları alarak NADH oluşturmak suretiyle, yükseltgeme-indirgeme reaksiyonlarında elektron taşıyıcısı olarak işlev yapmaktadır. (B) Örneğin, NAD$^+$ elektronları S1'den alarak, yükseltgenmiş S1 ve NADH oluşturmaktadır. Bu reaksiyonda oluşan NADH daha sonra elektronlarını ikinci bir substrata (S2) transfer ederek indirgenmiş S2 oluşturmakta ve NAD$^+$ rejenere edilmektedir. Net etki, (NADH) tarafından, elektronların S1'den (yükseltgenir) S2'ye (indirgenir) taşınmasıdır.

Tablo 2.1 Koenzimler ve Vitaminlere Örnekler

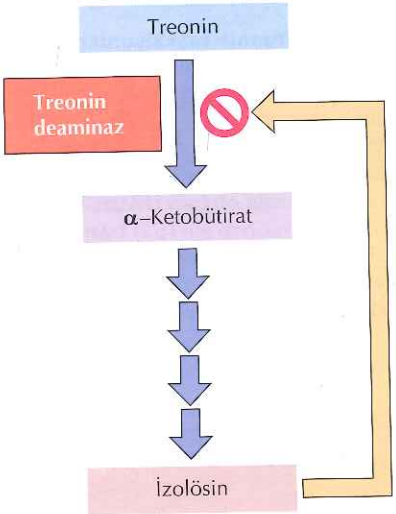
Koenzim	İlgili vitamin	Kimyasal reaksiyon
NAD^+, $NADP^+$	Niasin	İndirgenme-Yükseltgenme
FAD	Riboflavin (B2)	İndirgenme-Yükseltgenme
Tiamin Fosfat	Tiamin (B1)	Aldehid grubu transferi
Koenzim A	Pantotenat	Açil grubu transferi
Tetrahidrofolat	Folat	Metil grubu transferi
Piridoksal fosfat	Piridoksal (B6)	Transaminasyon
Biotin	Biotin	Karboksilasyon ve karboksil grubu transferi

kapasitesini kaybetmiş olan insanlarda ve diğer gelişmiş hayvanlarda diyetin gerekli bileşenleridir.

Enzim aktivitesinin düzenlenmesi

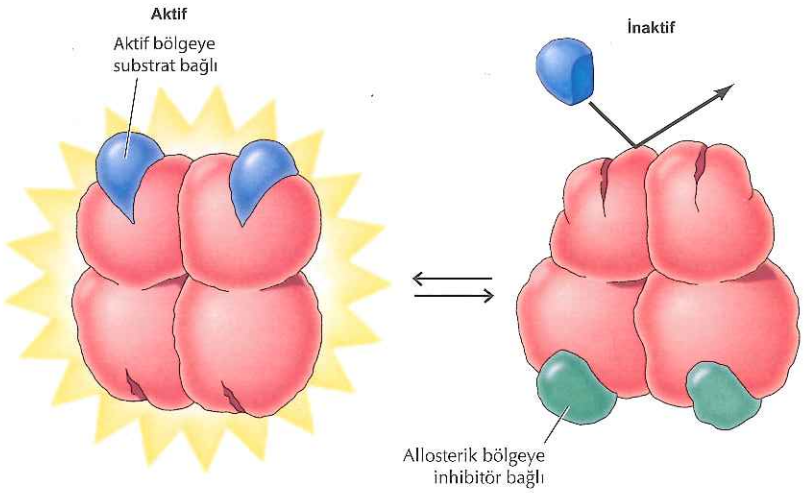
Enzimlerin çoğunluğunun önemli bir özelliği, etkinliğinin sabit olmayıp değiştirilebilir olmasıdır. Diğer bir deyişle, enzimlerin aktivitesi düzenlenebilmekte ve böylece enzimler hücrenin yaşamı boyunca ortaya çıkabilen çeşitli fizyolojik gereksinimleri karşılayabilecek şekilde işlev görebilmektedirler.

Sık rastlanan bir enzim düzenleme türü **geribesleme inhibisyonu** (***feedback inhibition***) olup, metabolik yolun ürünü kendisinin sentezinde rol alan enzimi inhibe etmektedir. Örneğin, izolösin amino asiti treonin amino asitinden başlayarak bir dizi reaksiyon ile sentezlenir (**Şekil 2.28**). Yolun ilk basamağı treonin deaminaz enzimi tarafından katalizlenmekte ve bu reaksiyon, yolağın son ürünü olan izolösin tarafından inhibe edilmektedir. Böylece, hücre içinde yeterli miktarda izolösin, treonin deaminaz enzimini inhibe etmekte, izolösinin daha fazla sentezini bloke etmektedir. İzolösin konsantrasyonu düştüğünde ise, geriye besleme inhibisyonu kaldırılmakta, treonin deaminaz artık inhibe olmamakta ve izolösin yeniden sentezlenmektedir. Treonin deaminaz aktivitesini regüle ederek, hücre gerekli miktarda izolösin sentezlemekte ve gereğinden fazla izolösin sentezi ile enerji israfını önlemektedir.



Geribesleme inhibisyonu, **allosterik düzeleme**'nin bir örneğidir. Allosterik düzenleme, enzim aktivitesinin küçük moleküllerin enzim üzerinde regülatör bölgelere bağlanması ile kontrol edildiği bir düzenleme türüdür (**Şekil 2.29**). "Allosterik düzenleme" terimi, regülatör moleküllerin, enzimin katalitik yüzeyine değil, protein üzerinde başka bir bölgeye (*allo* = "diğer" ve *sterik* = "bölge") bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Regülatör molekülün bağlanması proteinin konformasyonunu değiştirmekte; bu da, aktif yüzeyin şeklini değiştirerek enzimin katalitik aktivitesini etkilemektedir. Treonin deaminaz örneğinde, regülatör molekülün (izolösin) bağlanması enzimatik

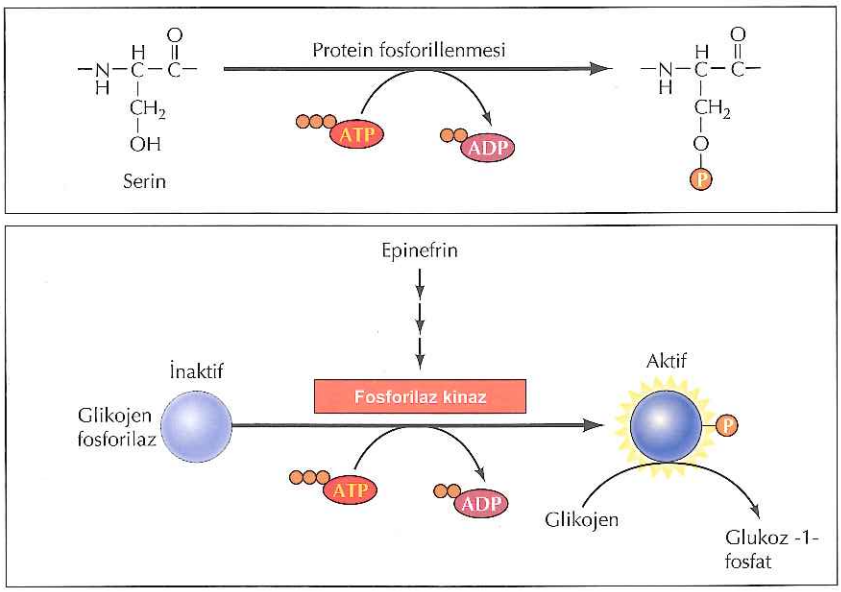
Şekil 2.28 Geribesleme inhibisyonu Treoninin izolösine dönüşümünde ilk basamak treonin deaminaz enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzimin etkinliği, yolun son ürünü olan izolösin tarafından inhibe edilmektedir.



Şekil 2.29 Allosterik regülasyon Bu örnekte, enzim aktivitesi, regülatör bir molekülün allosterik bölgeye bağlanmasıyla inhibe edilmektedir. İnhibitörün yokluğunda, substrat, enzimin aktif bölgesine bağlanmakta ve reaksiyon ilerlemektedir. Allosterik yüzeye bir inhibitörün bağlanması enzimde konformasyonel bir değişiklik yaratmakta ve substratın bağlanmasını önlemektedir. Allosterik enzimlerin çoğunluğu birden çok alt birim içermektedir.

aktiviteyi inhibe etmektedir. Diğer bazı durumlarda, regülatör moleküller, hedef enzimlerini inhibe etmek yerine, aktivatör olarak işlev yapmaktadır.

Enzimlerin aktiviteleri, diğer proteinlerle etkileşimler yoluyla ve kovalent modifikasyonlar ile de regüle edilebilmektedir: serin, treonin veya tirozine fosfat gruplarının eklenmesi gibi. **Fosforillenme**, enzim aktivitesinin düzenlenmesinde ortak bir mekanizmadır; fosfat gruplarının eklenmesi, çeşitli enzimlerin aktivitelerini artırabilir ya da inhibe edebilir (**Şekil 2.30**). Örneğin, kas hücreleri epinefrine (adrenalin), glikojeni glukoza yıkarak yanıt verirler; böylece, artan kas aktivitesi için enerji kaynağı sağlanmaktadır. Glikojenin yıkılımı glikojen fosforilaz enzimi tarafından katalizlenmektedir; bu da, epinefrinin kas hücre yüzeyinde bir reseptöre bağlanmasına yanıt olarak



Şekil 2.30 Proteinlerin fosforillenmesi Bazı enzimler, serin, treonin ya da tirozinin yan zincir OH gruplarına fosfat gruplarının eklenmesi ile regüle edilirler (burada görüldüğü gibi). Örneğin, glikojenin glukoz-1-fosfata yıkılmasını katalizleyen glikojen fosforilaz enzimi, epinefrinin kas hücrelerine bağlanmasına yanıt olarak oluşan fosforilasyon yoluyla aktive edilir.

oluşan fosforillenme ile aktive olmaktadır. Protein fosforillenmesi, yalnızca metabolik reaksiyonların değil, hücre çoğalması ve farklılaşması gibi birçok diğer hücresel fonksiyonların kontrolünde de merkezi bir role sahiptir.

Hücre Zarları

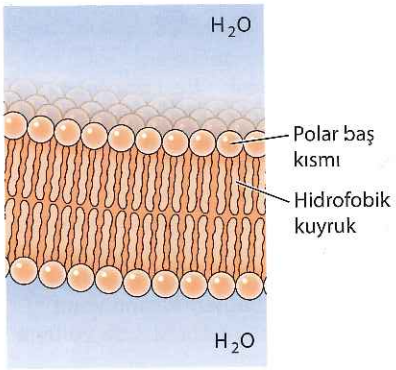
Hücrelerin yapı ve işlevleri zarlara sıkıca bağlıdır; zarlar yalnızca hücrenin içini çevresinden ayırmakla kalmazlar; aynı zamanda, ökaryot hücrelerin, nükleus ve sitoplazmik organeller dahil olmak üzere, iç bölümlerini belirler. Biyolojik zarların oluşumu lipidlerin özelliklerine dayalıdır ve her hücre zarı ortak bir yapısal düzen içindedir: proteinlerle ilişkili fosfolipid çift-tabakaları. Bu zar proteinleri birçok özgülleşmiş fonksiyondan sorumludur; bazıları, hücrelerin dış uyaranlara yanıt vermesini sağlayan reseptörler olarak davranırlar; bazıları zarın bir ucundan diğerine moleküllerin seçici taşınımını sağlarlar ve diğerleri elektron taşımını ile oksidatif fosforilasyona katılır. Buna ek olarak, zar proteinleri çok hücreli organizmaların hücreleri arasındaki etkileşimleri kontrol ederler. Böylece, zarların ortak yapısal organizasyonları çok çeşitli biyolojik olaylara ve daha ilerki bölümlerde görüleceği üzere, özgülleşmiş fonksiyonlara zemin yaratır.

Zar lipidleri

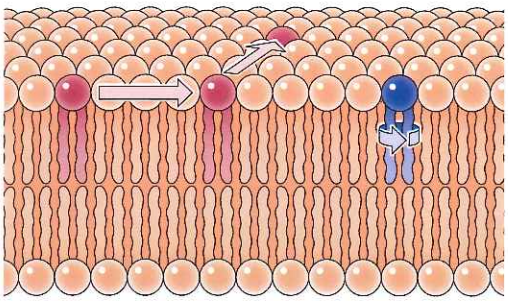
Hücre zarlarının temel yapı taşları fosfolipidlerdir: fosfolipidler, fosfat içeren hidrofilik bir baş kısma bağlanmış iki adet hidrofobik yağ asiti zincirinden oluşan amfipatik moleküllerdir (bkz. Şekil 2.7). Yağ asiti kuyrukları suda zayıf çözünürlüğe sahip olduklarından, fosfolipidler sulu çözeltilerde kendiliğinden çift-tabaka oluştururlar; hidrofobik kuyruk kısımlar zarın iç bölümüne gömülüdür ve de polar baş kısımlar, zarın her iki yüzeyinde, su ile temas halindedir (**Şekil 2.31**). Bu **fosfolipid çift-tabakalar**, iki sulu kompartman arasında kararlı bir bariyer oluşturur ve tüm biyolojik zarların temel yapısını temsil eder.

Lipidler çoğu hücre zarlarının kütlesinin takriben %50'sini oluşturur; ancak bu oran, zarın tipine bağlı olarak değişebilmektedir. Örneğin, plazma zarları, takriben %50 lipid ve %50 proteinden oluşur. Diğer taraftan, mitokondrinin iç zarı, sıkça rastlanmayan yüksek bir protein oranı (%75 civarında) içerir ki bu, elektron taşıma ve oksidatif fosforilasyonla ilişkili protein komplekslerinin bolluğunu yansıtır. Değişik hücre zarlarının da lipid bileşimi farklılıklar gösterir. *E. coli*'nin plazma zarları çoğunlukla, fosfatidiletanolaminden ibarettir. Memelilerin plazma zarları daha komplekstir; beş temel fosfolipid içerirler: fosfatidilkolin, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositol ve sfingomiyelin. Fosfolipidlere ilave olarak, hayvan hücrelerinin plazma zarları glikolipid ve kolesterol (karbohidrat baş grupları vardır) içerir ki bunlar total lipid moleküllerinin yarısına karşılık gelir.

Lipid çift-tabakalarının önemli bir özelliği, moleküllerin her birinin (hem lipidler hem de proteinler) dönmeleri ve yana doğru hareket etmeleri için



Şekil 2.31 Bir fosfolipid çift tabaka Fosfolipidler kendiliğinden, polar baş kısımları su ile temasta, hidrofobik kuyruk bölümleri zarın içine gömülü olarak, kararlı çift-tabakalar oluştururlar.



Şekil 2.32 Bir zarda fosfolipidlerin hareketleri Her bir fosfolipid, bir çift-tabakanın içinde, dönebilirler ya da yanlara doğru hareket edebilirler.

serbestlik sağlayan iki-boyutlu sıvı olmalarıdır (Şekil 2.32). Bu akışkanlık, zarların çok önemli bir özelliğidir ve hem sıcaklık, hem de lipid bileşimi ile belirlenir. Örneğin, kısa zincirli yağ asitleri arasındaki etkileşim, uzun zincirli yağ asitleri arasındaki etkileşimlerden daha zayıftır; böylece, daha çok kısa zincirli yağ asiti içeren zarlar, daha az katı olup daha düşük sıcaklıklarda sıvı olarak kalabilirler. Doymamış yağ asitleri içeren lipidler benzer olarak zarın akışkanlığını artırırlar, çünkü çift bağların varlığı yağ asiti zincirlerinde bükülmeler oluşturur ve bu da paketlenmeyi zorlaştırır.

Bilgi İçin

Bitkiler soğuğu nasıl algılar? Eldeki kanıtlar, bitkilerin sıcaklık derecesideki düşüşleri, zarlarının akışkanlığındaki değişiklerle algıladıkları yönündedir.

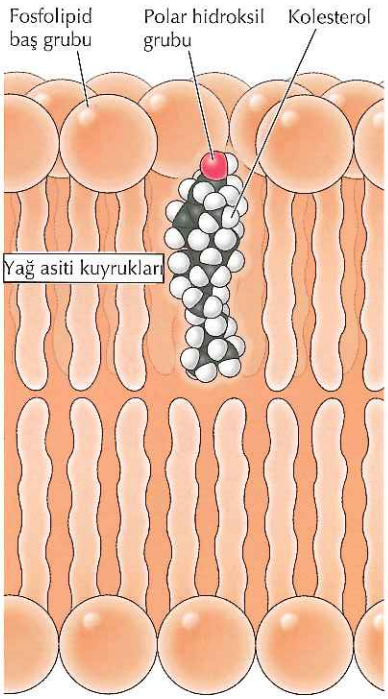
Hidrokarbon halka yapısı nedeniyle (bkz. Şekil 2.9), kolesterol, zar akışkanlığını belirlemede belirgin bir role sahiptir. Kolesterol molekülleri, polar hidroksil grupları ile, fosfolipidlerin polar baş kısımlarının yakınından çift-tabakaya katılırlar (Şekil 2.33). Bu nedenle, kolesterolün katı hidrokarbon halkaları, fosfolipid baş kısımlara komşu olan yağ asiti zincirleri ile etkileşime girerler. Bu etkileşim, yağ asiti zincirlerinin dış kısımlarının mobilitesini azaltarak zarın bu kısmını daha katı bir duruma getirir. Diğer taraftan, kolesterolün yapıya katılması yağ asiti zincirleri arasındaki etkileşimleri engelleyerek, daha düşük sıcaklıklarda zar akışkanlığının devam etmesini sağlar.

Video 2.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v2.1
Kolesterolün Lipid Çift Tabakada Düzenleyici Etkisi
Kolesterol molekülü bir zarda, çift tabakanın fosfolipidlerinin düzenlenmesini etkiler.

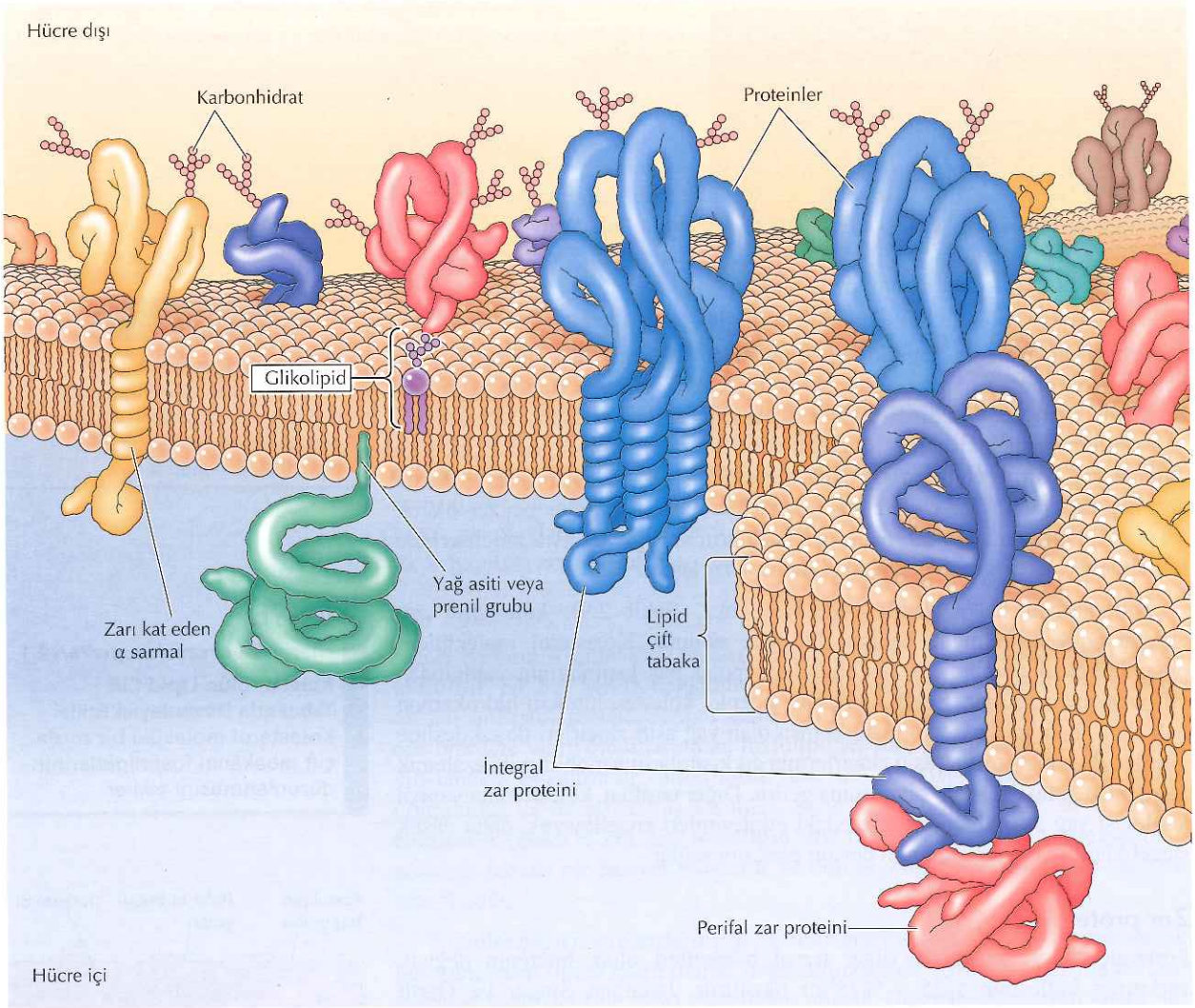
Zar proteinleri

Proteinler hücre zarlarının diğer temel bileşenleri olup, hücrenin değişik zarlarının kütlesinin %25 - %75'ini oluşturur. Jonathan Singer ve Garth Nicolson tarafından 1972'de öne sürülen güncel zar yapısında, zarlar, proteinlerin bir lipid çift-tabakanın içine gömüldükleri bir **akışkan mozaik** modeli olarak gösterilmektedir (Şekil 2.34). Fosfolipidler zarların temel yapısal düzenini oluştururken, zar proteinleri hücrenin değişik zarlarının özgül işlevlerini yerine getirmektedir. Bu proteinler, zarla ilişkilerine göre iki temel sınıfta toplanırlar. **İntegral zar proteinleri** lipid çift-tabakanın içine doğrudan gömülmüşlerdir. **Periferal zar proteinleri** lipid çift-tabakanın içine gömülmezler, fakat zarla indirekt olarak, genelde integral zar proteinleri ile etkileşimler yoluyla ilişkilidirler.

İntegral zar proteinlerinin çoğu (**transmembran proteinler** de denilmektedir) lipid çift-tabaka boyunca uzanırlar ve zarın her iki yüzünde de bölümleri vardır.



Şekil 2.33 Kolesterolün bir zara katılımı Kolesterol, polar hidroksil grubu, fosfolipidlerin polar baş kısımları ile yakın olacak şekilde, zarın içine katılır.



Şekil 2.34 Zar yapısının akışkan mozaik modeli Biyolojik zarlar, bir çift-tabaka içine gömülü proteinlerden oluşmaktadır. İntegral zar proteinleri, genelde, 20-25 hidrofobik amino asitlik α-sarmal bölgeleri ile, zarın içinde gömülüdür. Bazı transmembran proteinler zarı bir kez geçerler diğerleri, birden fazla zarı geçen bölüme sahiptir. Buna ilave olarak, bazı proteinler, zara, polipeptid zincirlerine kovalent olarak bağlı lipidler tarafından tutunurlar. Bu proteinler, plazma zarının hücre dışı yüzüne glikolipidler ile, sitozolik yüzüne de, yağ asitleri ya da prenil gruplar ile tutunurlar (yapılar için Bölüm 9'a bakınız). Periferal zar proteinleri, zarın içine gömülü değildir, ancak integral zar proteinlerine veya fosfolipidlere ile etkileşimler yoluyla tutunmuştur.

Bu proteinlerin zarın içinde uzanan bölümleri genellikle 20-25 nonpolar amino asitler içeren α-sarmal bölgeleridir. Bu amino asitlerin hidrofobik yan zincirleri, zar lipidlerinin yağ asiti zincirleri ile etkileşime girer ve α-sarmalın oluşması, bu bölümde daha önce protein katlanması ile ilgili olarak açıklandığı gibi,

Anahtar Deney

Hücre Zarlarının Yapısı

The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes

S. J. Singer and Garth L. Nicolson
University of California at San Diego and the Salk Institute for Biological Sciences, La Jolla, CA
Science, Volume 175, 1972, pages 720-731

Bağlam

Hücre zarlarının, ökaryotik hücrenin içeriğini dış ortamdan ayırarak hücreleri tanımlamanın yanısıra, hücrelerin subselüler organellerinin sınırlarını belirlemede görev almak gibi, hücre biyolojisinin hemen her yönünde merkezi rolleri vardır. Bu nedenle, hücre zarlarının yapı ve düzenlerinin anlaşılması hücre davranışının moleküler temelenin açığa kavuşturulmasında kritik bir adımdır. 1960'larda, hücre zarlarının protein ve lipidden oluştuğu bilinmekle birlikte bu moleküllerin düzeni konusunda açıklık yoktu. Ayrıca, değişik hücre zarlarının protein ve lipid bileşimlerinde büyük miktarda varyasyon söz konusu idi ki bu, araştırıcıları, değişik zarların ortak bir yapısal düzen içermediğini düşünmelerine yol açmıştı.

Buna karşı olarak, Jonathan Singer ve Garth Nicolson, zar yapısının anlaşılması problemine, lipid ve proteinlerin düzeni açısından hücre zarlarının tümünde aynı genel ilkelerin geçerli olacağı varsayımı ile yaklaştılar. Termodinamiğin ilkelerini uygulayarak ve bir dizi deneysel bulguyu bir araya getirerek, sıvı mozaik modeli oluşturdular. Bu model, popülerliğini korudu ve hücre biyolojisinde zarların çeşitli işlevlerinin anlaşılması için yapısal bir temel oluşturdu.

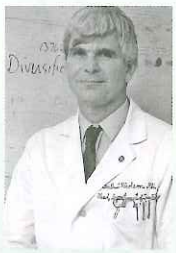
Deneyler

Singer ve Nicolson'un sıvı mozaik modelinin geliştirilmesinde termodinamik kurallar esası oluşturdu. Özellikle, zarların genel yapılarının hidrofobik ve hidrofilik etkileşimlerin kombinasyonu ile saptanabileceğini düşündüler. Bu etkileşimler, fosfolipid çift tabakanın düzenlenmesinde temel etmenler olarak tanındılar ve Singer ile Nicolson, zar proteinlerinin düzenlenmesindeki de benzer etkişelimlerin rol oynadığını varsaydılar. Bu yüzden, zar proteinlerinin nonpolar amino asit kalıntılarının, yağ asiti zincirleri gibi zarın içinde konumlandığını; diğer taraftan, proteinlerin polar gruplarının sulu dış ortamla temasta olduğunu düşündüler. Bu fikirler, zarların iki protein tabaka arasında bir iç lipid tabaka halinde sıralandığı üç tabakalı bir yapı içeren daha eski bir zar yapısı modeline ters düşmekte idi.

Bunun yerine, Singer ve Nicolson globüler integral zar proteinlerinin bir fosfolipid çift tabakaya eklendiği bir mozaik yapıyı önerdiler (bkz. şekil). Proteinlerin, fosfolipidler gibi, amfipatik olduğunu düşünerek; nonpolar bölgelerin lipid çift-tabakaya gömüldüğü ve polar bölgelerin sulu dış ortamla buluştuğu bir yapıyı ortaya attılar. Bu çift tabakanın, proteinlerin gömülü oldukları bir yapısal matris oluşturduğu düşünüldü.

Sıvı mozaik modeli destekleyen bir dizi deneysel veri yayımlandı. İlk olarak, dondurup çatlatma (*freeze fracture*) tekniğinin kullanılması ile zarların elektron mikrografileri, proteinlerin lipid çift tabakanın içinde gömülü olduğunu doğrudan kanıtlayan veriler sağladı (Bkz. Şekil 1.37). Ayrıca, hücre yüzeyi boyaları ile, proteinlerin sıvı mozaik modelinde öngördüğü gibi, zarın yüzeyinde rastgele dağılım gösterdikleri bulundu.

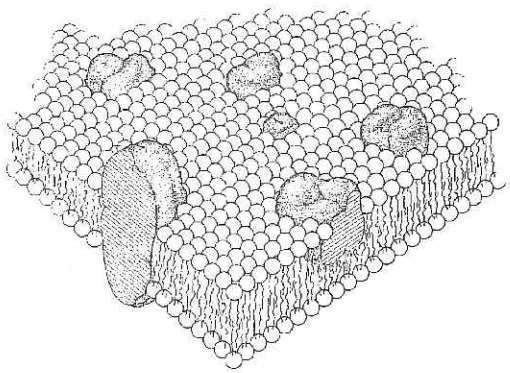
S. J. Singer



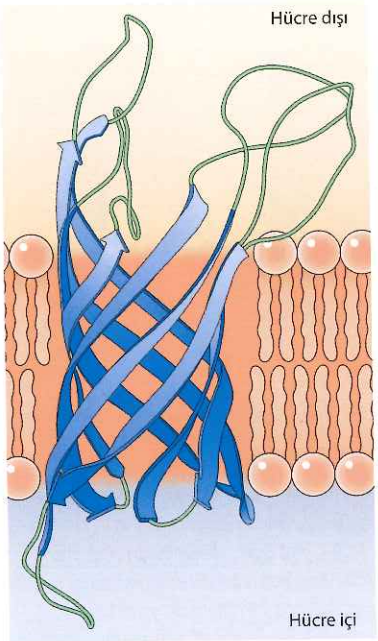
Garth L. Nicolson

Etki

Singer ve Nicolson'un sıvı mozaik modeli, ileri deneyler ile güçlü bir şekilde desteklenmiş olup, hücre zarlarının yapısı konusundaki temel anlayışımızı temsil etmeye devam etmektedir. Hücre biyolojisinde zarların enerji metabolizması, hormonal etki ve bir sinapstaki sinir hücreleri arasında bilgi iletimi gibi çok farklı rolleri göz önüne alındığında, sıvı mozaik modeli, hücre davranışının hemen tüm yönlerinin anlaşılmasına temel oluşturmaktadır. Başlangıçta, lipid ve proteinlerin özelliklerinin termodinamik yönden değerlendirmesi temelinde ilerleyerek, Singer ve Nicolson hücre biyolojisinin tüm yönlerini etkileyen bir zar yapısı modeli geliştirdiler.



Lipid-globüler protein mozaik modeli Globüler proteinler fosfolipidlerin oluşturduğu bir matriks içinde dağılmıştır.



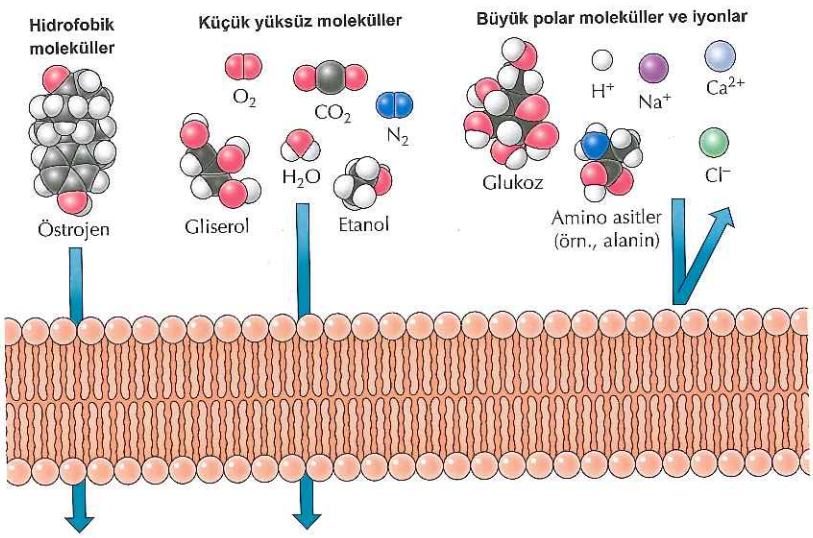
Şekil 2.35 **β-fıçı yapısının organizasyonu** Bazı transmembran proteinler fosfolipid çift-tabakayı, fıçıya benzer bir yapıda katlanmış olan β-tabakalar ile geçer.

peptid bağlarının polar karakterini nötralize eder. Lipid çift-tabakaları geçen tek diğer protein yapısı olarak, β-tabakaların fıçıya benzer bir yapı oluşturdukları **β-fıçı** yapısı bilinmektedir ki bu yapı, bakteri, kloroplastlar ve mitokondrilerin transmembran proteinlerinde görülmektedir (**Şekil 2.35**). Fosfolipidler gibi, transmembran proteinler, hidrofilik kısımları zarın her iki yüzeyindeki sulu ortamlar ile temas halinde olan amfipatik moleküllerdir. Bazı transmembran proteinler zarı yalnızca bir kez geçmektedir; diğerlerinin zarı geçen çok sayıda bölgeleri vardır. Ökaryotik plazma zarlarının transmembran proteinlerinin çoğu, karbohidratların bağlanmasıyla modifiye olmuşlardır. Bu karbohidratlar, hücrenin dışı ile temastadır ve hücre-hücre etkileşimlerine katılabilirler.

Proteinler aynı zamanda, polipeptid zincirlerine kovalent olarak bağlanan lipidler tarafından da zarlara tutunurlar (bkz. Bölüm 9). Belirli lipid modifikasyonları, proteinleri plazma zarının sitozolik ve hücre dışı yüzüne tutturur. Proteinler ya 14-karbonlu bir yağ asitinin (miristik asit) ya da 16-karbonlu bir yağ asiti (palmitik asit) amino ucuna eklenmesi, veya 15-20-karbonlu prenil gruplarının sistein birimlerinin yan zincirlerine eklenmeleriyle, zarın sitozolik yüzüne tutunurlar. Alternatif olarak, proteinler plazma zarının hücre dışı yüzüne, karboksi uçlarına glikolipidlerin bağlanmasıyla tutunurlar.

Hücre zarlarından taşıma

Biyolojik zarların küçük moleküllere seçici geçirgenliği, hücreye iç bileşimini kontrol etme ve sürdürme olanağını vermektedir. Fofolipid çift-tabakadan yalnızca küçük ve yüksüz moleküller serbestçe geçebilir (**Şekil 2.36**). O_2 ve CO_2 gibi küçük nonpolar moleküller lipid çift-tabakada çözünürler ve dolayısıyla hücre zarlarını rahatça geçerler. H_2O gibi, küçük, yüksüz ve polar moleküller de zarları geçebilirler; ancak, glukoz gibi büyük, yüksüz polar moleküller geçemez. İyonlar gibi yüklü moleküller, büyüklüklükleri ne olursa olsun, fosfolipid çift-tabakayı geçemez; H^+ iyonları bile serbest difüzyon ile



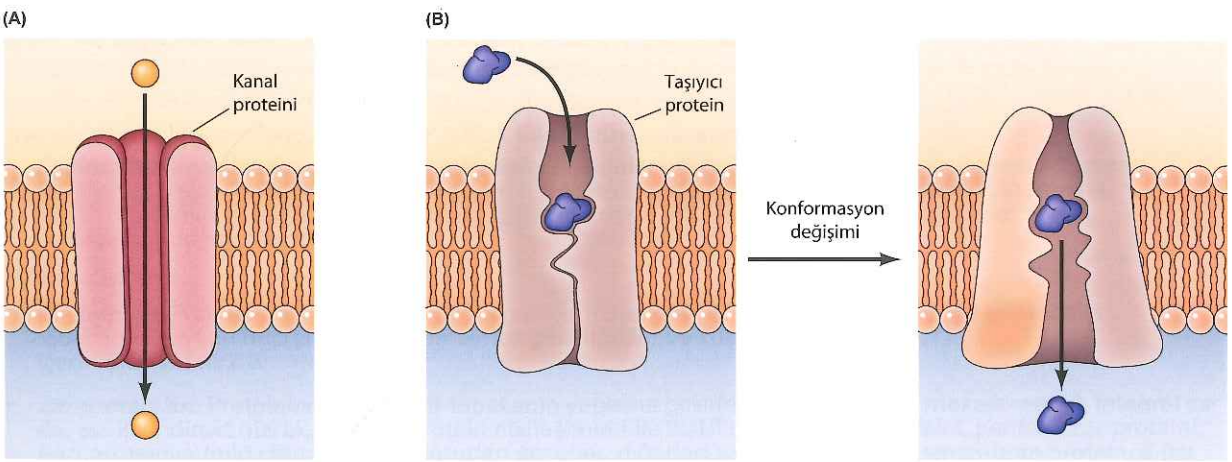
Şekil 2.36 **Fosfolipid çift-tabakaların geçirgenliği** Gazlar, hidrofobik ve küçük yüksüz moleküller fosfolipid çift-tabakadan serbestçe difüze olabilirler. Ancak, çift-tabaka, daha büyük polar moleküllere (örn., glukoz ve amino asitler) ve iyonlara geçirgen değildir.

lipid çift-tabakayı geçemez.

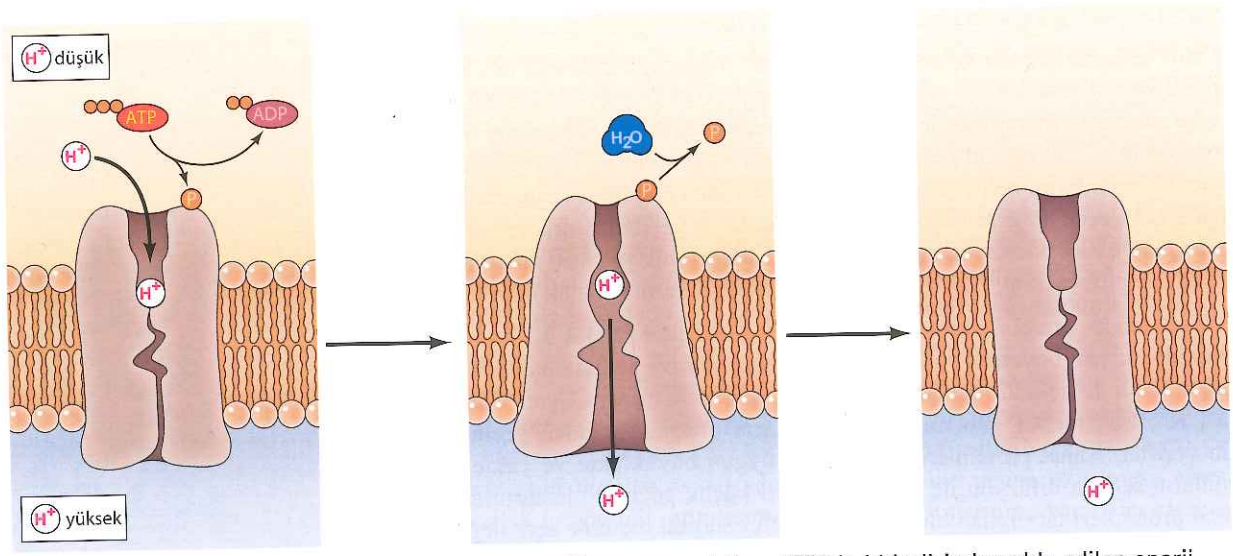
Her ne kadar iyonlar ve polar moleküllerin çoğunluğu lipid çift-tabakadan difüze olamazlarsa da, bu tür birçok molekül (glukoz gibi) hücre zarlarını geçebilmektedir. Bu moleküller zarları, taşıyıcı adı verilen özgül transmembran proteinlerinin aracılığı ile geçerler. Bu tür taşıma proteinleri hücre zarlarının seçici geçirgenliğini belirleyerek, zar fonksiyonunda önemli rol oynarlar. Çok sayıda zarı geçen bölgeleri ile lipid çift-tabakada bir geçit oluştururlar ve polar veya yüklü moleküllerin, zar fosfolipidlerinin hidrofobik yağ asiti zincirleriyle etkileşime girmeksizin, bir protein geçitinden geçmelerine olanak tanırlar.

Zar taşıyıcı proteinlerinin iki genel sınıfı mevcuttur (Şekil 2.37). **Kanal proteinleri**, zar boyunca açık geçitler oluştururlar ve uygun büyüklükteki herhangi bir molekülün geçmesine olanak verirler. Örneğin, iyon kanalları Na^+, K^+, Ca^{2+} ve Cl^- gibi inorganik iyonların plazma zarından geçmesine izin verirler. Kanal proteinleri açıldığında, uygun büyüklükte ve yükte olan iyonların serbest difüzyon ile geçebilecekleri küçük geçitler oluştururlar. Bu kanal proteinleri tarafından oluşturulan geçitler sürekli biçimde açık değildir. Daha çok, hücre dışı sinyallere bağlı seçici olarak açılır ve kapanırlar, böylece hücrenin, iyonların zarlardan geçişlerini kontrol etmesine olanak tanırlar. Bu tür kontrollü iyon kanallarının özellikleri elektrokimyasal sinyallerin iletilmesine aracı oldukları sinir ve kas hücrelerinde, çok iyi incelenmiş durumdadır.

Kanal proteinlere zıt olarak **taşıyıcı proteinler**, glukoz gibi küçük molekülleri seçici olarak bağlayarak taşırlar. Açık kanallar oluşturmaktan ziyade, taşıyıcı enzimler gibi davranarak spesifik moleküllerin zarlardan geçişlerini kolaylaştırırlar. Özellikle, taşıyıcı proteinler spesifik moleküllere bağlandıklarında konformasyonal değişikliğe uğrayarak, moleküllerin zarın bir tarafından diğer tarafına taşınacağı ve diğer tarafta serbestleştirileceği kanallar oluştururlar.



Şekil 2.37 Kanal ve taşıyıcı proteinler (A) Kanal proteinleri, uygun büyüklükteki moleküllerin (örn., iyonlar) rahatça zarı geçebileceği açık porlar (geçitler) oluştururlar. (B) Taşıyıcı proteinler seçici olarak taşınacak küçük molekülü bağladıktan sonra, bir konformasyonel değişiklik geçirerek, molekülü zarın diğer tarafında serbestleştirirler.



Şekil 2.38 Aktif taşıma modeli ATP'nin hidrolizinden elde edilen enerji, H^+'i, konsantrasyon gradientinin ters yönünde (düşük H^+ konsantrasyonundan yüksek konsantrasyona) taşımak için kullanılır. H^+'in bağlanmasından sonra, taşıyıcı protein fosforillenir ve bu durum konformasyonel değişikliği indükler ve H^+'in elektrokimyasal gradiente ters yönde taşınması gerçekleşir. H^+'in serbestleşmesi ve bağlı fosfat grubunun hidrolizi, taşıyıcıyının başlangıç haline dönüşmesini sağlar.

Animasyon 2.4
sites.sinauer.com/cooper7e/a2.4
Pasif Taşıma Bir zarı enerji yönünden uygun yönde geçen moleküller, bunu pasif taşıma yolu ile yaparlar.

Şu ana kadar tanımlandığı gibi, moleküller zarları, gerek kanal, gerekse taşıyıcı proteinlerle, enerjetik olarak elverişli yönde geçerler. Bu süreç konsantrasyon ve elektrokimyasal gradientlerle belirlenmektedir ve **pasif taşıma** olarak adlandırılmaktadır. Ancak taşıyıcı proteinler, zar boyunca taşınan moleküllerle ilişkili enerji değişikliklerini, başka metabolik enerji formlarının kullanımı ya da üretimi ile kenetleyen bir mekanizma oluşturabilirler: enzimatik reaksiyonların ATP hidrolizi ya da sentezine kenetlendiği gibi. Örneğin, zarın bir yüzünden diğer yüzüne moleküller, enerjetik olarak elverişsiz bir yönde taşınabilir (örn, konsantrasyon gradiyentine ters yönde). Eğer, bu yöndeki taşınmaları enerji kaynağı olarak ATP hidrolizine kenetlenmiş ise, işte bu işleme **aktif taşıma** adı verilir (Şekil 2.38). ATP olarak depolanmış olan serbest enerji bu şekilde, hücrenin iç bileşimini kontrol etmek için kullanılabilmektedir.

ÖZET

Hücre Molekülleri

- ***Karbohidratlar:*** Karbohidratlar, basit şekerleri ve polisakkaridleri içerirler. Polisakkaridler şekerlerin depo formlarıdır, hücrelerin yapısal bileşenleri ve hücre tanıma süreçlerinde belirteç olarak işlev görürler. Bkz. **Animasyon 2.1**

- ***Lipidler:*** Lipidler hücre zarlarının temel komponentleridir ve enerji deposu ve sinyal molekülleri olarak işlev görürler. Fosfolipidler hidrofilik bir fosfat içeren baş kısma bağlanmış iki hidrofobik yağ asiti zincirini içerir.

- ***Nükleik asitler:*** Nükleik asitler hücrenin temel bilgi molekülleridir. Hem DNA hem de RNA pürin ve pirimidin nükleotidlerinin polimerleridir. Komplementer baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları, nükleik asitlere kendi kendini kopyalamayı yönetme özelliğini verir.

- ***Proteinler:*** Proteinler, her biri spesifik kimyasal özellikleri olan farklı yan zincirler taşıyan, 20 değişik amino asitin polimerleridir. Her bir proteinin üç boyutlu yapısını belirleyen, belirli bir amino asit dizilimi vardır. Proteinlerin çoğunluğunda, α sarmallar ve β tabakalar, globüler bölgelere katlanırlar ve hidrofobik amino asitler iç kısımda, hidrofilik amino asitler yüzeyde yerleşim gösterirler. Bkz. **Video 2.1**

Biyolojik Katalizörler Olarak Enzimler

- ***Enzimlerin katalitik aktiviteleri:*** Hücrelerde yer alan hemen tüm tepkimeler enzimler tarafından katalizlenirler. Bkz. **Animasyon 2.2**

- ***Enzimatik kataliz mekanizmaları:*** Enzimler, uygun pozisyonda substratları bağlayarak, geçiş durumuna ulaşmak üzere substratların konformasyonlarını değiştirerek ve kimyasal reaksiyonlarda doğrudan yer alarak, tepkime hızını arttırırlar. Bkz. **Animasyon 2.3**

- ***Koenzimler:*** Koenzimler enzimlerle birlikte işlev görerek substratlar arasında kimyasal grupları taşırlar.

- ***Enzim aktivitesinin düzenlenmesi:*** Enzimlerin aktiviteleri, hücrenin fizyolojik gereksinimlerini karşılamak üzere düzenlenir. Enzim aktivitesi, küçük moleküllerin bağlanması ile, başka proteinlerlerle etkileşim ile ve kovalent değişimler ile düzenlenir.

Hücre Zarları

- ***Zar lipidleri:*** Tüm hücre zarlarının temel yapısı bir fosfolipid çift-tabakadır. Hayvan hücrelerinin zarları ayrıca glikolipidler ve kolesterol içerir. Bkz. **Video 2.2**

- ***Zar proteinleri:*** Proteinler ya lipid çift-tabakanın yapısına girerler, ya da, zar ile indirekt olarak, protein-protein etkileşimleri ile ilişkilidirler. Bazı proteinler lipid çift-tabakayı doğrudan geçerler, diğerleri zarın bir tarafına tutunurlar.

- ***Hücre zarlarından taşıma:*** Lipid çift-tabakalar yalnızca küçük yüksüz moleküllere geçirgendir. İyonlar ve polar moleküllerin çoğunluğu hücre zarlarından spesifik taşıma proteinleri ile taşınırlar bu olay, ATP'nin hidrolizi ya da sentezi ile kenetlenebilir. Bkz. **Animasyon 2.4**

ANAHTAR SÖZCÜKLER

hidrofilik, hidrofobik, karbohidrat, monosakkarid, glikozid bağı, oligosakkarid, polisakkarid, glikojen, nişasta, selüloz, kitin

lipid, yağ asiti, triaçilgliserol, yağlar, fosfolipid, gliserol fosfolipid, sfingomiyelin, amfipatik, glikolipid, kolesterol, steroid hormon

deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA), haberci RNA (mRNA), ribozomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA), nükleotid, pürin, pirimidin, adenin, guanin, sitozin, timin, urasil, 2'-dezoksiriboz, riboz, nükleozid, fosfodiester bağı, oligonükleotid, polinükleotid

protein, amino asit, peptid bağı, polipeptid, X-ışınları kristallografisi, primer yapı, ikincil yapı, α-sarmal, β-tabaka, üçüncül yapı, bölge, dördüncül yapı

enzim, substrat, ürün, geçiş durumu, aktivasyon enerjisi, aktif bölge

anahtar-kilit modeli, indüklenmiş uyum

prostetik grup, koenzim, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)

geribesleme inhibisyonu, allosterik düzenleme, fosforilasyon

fosfolipid çift-tabaka

Sıvı mozaik model, integral zar proteini, periferal zar proteini, transmembran protein, β-fıçı modeli

kanal proteini, taşıyıcı protein, pasif taşıma, aktif taşıma

Atıf

Hücre

Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Sorular

1. Suyun hangi özellikleri onu hücreler için en çok bulunan molekül olarak işlev görmesini sağlamıştır?
2. Glikojen ile selüloz, her ikisi de glukoz monomerlerinden oluştuğu halde, kimyasal olarak farklılıdırlar. Aralarındaki farklılık nedir?
3. Hücrelerde yağların ve fosfolipidlerin temel fonksiyonları nelerdir?
4. Nükleik asitlerin yapı taşları olmalarının yanısıra, nükleotidlerin hücrelerdeki diğer önemli fonksiyonları nelerdir?
5. Bir mRNA molekülünden tüm bazları kaldırırsanız, yine de bilgi taşıyan bir molekül olarak işlevini sürdürebilir miydi?
6. Protein katlanması için gerekli olan bilgilerin, proteinin amino asit dizisi içinde mevcut olduğunu ispatlayan deneysel kanıt nedir?
7. Sistein yan zinciri belirli proteinlerin katlanmasında nasıl yardımcı olur?
8. Kolesterolün biyolojik rolleri nelerdir?
9. Neden transmemban proteinlerin zarı geçen bölümleri genellikle α-sarmal yapıdadır? Zarı geçme yeteneği olan diğer protein yapı nedir?
10. α-sarmalın membranı geçen bölümünde aşağıdaki amino asitlerden hangisine rastlanır?
    a. Lizin
    b. Glutamin
    c. Aspartik asit
    d. Alanin
    e. Arjinin
11. Tripsinin bağlanma cebinde bir aspartat kalıntısı bulunmaktadır. Bu amino asitin lizin ile yer değiştirmesi durumunda enzim aktivitesi nasıl etkilenir?
12. Histidinin hangi özelliği, onun hidrojen iyonlarının yer aldığı enzimatik tepkimelerde rol almasını sağlar?
13. Taşıyıcı proteinler, kanal proteinlerinden nasıl farklıdırlar?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

(Her ana bölüm için en önemli anahtar derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Hücre Molekülleri

Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230. [P]

Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer. 2011. *Biochemistry.* 7th ed. New York: W. H. Freeman.

Branden, C. and J. Tooze. 1999. *Introduction to Protein Structure.* 2nd ed. New York: Garland.

Braselmann , E., J. L. Chaney and P. L. Clark. 2013. Folding the proteome. *Trends Biochem. Sci.* 38: 337-344. [R]

Dill, K. A. and J. L. MacCallum. 2012. The protein-folding problem, 50 years on. *Science* 338: 1042-1046. [R]

Kendrew, J. C. 1961. The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* 205(6): 96-111. [R]

Nelson, D. L. and M. M. Cox. 2012. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 6th ed. New York: W. H. Freeman.

Pauling, L., R. B. Corey, and H. R. Branson. 1951. The structure of proteins: Two hydrogen bonded configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37: 205-211. [P]

Petsko, G. A. and D. Ringe. 2003. *Protein Structure and Function.* Sunderland, Mass.: Sinauer.

Sanger, F. 1988. Sequences, sequences, and sequences. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 1-28. [R]

Tanford, C. 1978. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 200: 1012-1018. [R]

Biyolojik Katalizörler Olarak Enzimler

Changeux, J.-P. 2013. 50 years of allosteric interactions: the twists and turns of the models. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 819-829. [R]

Fersht, A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* New York: W. H. Freeman.

Koshland, D. E. 1984. Control of enzyme activity and metabolic pathways. *Trends Biochem. Sci.* 9: 155-159. [R]

Laskowski, R. A., F. Gerick and J. M. Thornton. 2009. The structural basis of allosteric regulation in proteins. *FEBS Letters.* 583: 1692-1698. [R]

Lienhard, G. E. 1973. Enzymatic catalysis and transition-state theory. *Science* 180: 149-154. [R]

Lipscomb, W. N. 1983. Structure and catalysis of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 17-34. [R]

Monod, J., J.-P. Changeux and F. Jacob. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6: 306-329. [P]

Narlikar, G. J. and D. Herschlag. 1997. Mechanistic aspects of enzymatic catalysis: Lessons from comparison of RNA and protein enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 19-59. [R]

Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224: 350-357. [R]

Petsko, G. A. and D. Ringe. 2003. *Protein Structure and Function.* Sunderland, Mass: Sinauer.

Schramm, V. L. 1998. Enzymatic transition states and transition state analog design. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 693-720. [R]

Hücre Zarları

Bretscher, M. 1985. The molecules of the Cell membrane. *Sci. Am.* 253(4): 100-108. [R]

Dowham, W. 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Ann. Rev. Biochem.* 66: 199-212. [R]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 121-138. [R]

Farazi, T. A., G. Waksman and J. I. Gordon. 2001. The biology and enzymology of protein *N*-myristoylation. *J. Biol. Chem.* 276: 39501-39504. [R]

Lacapere, J.-J., E . Pebay-Peyroula, J.-M. Neumann and C. Etchebest. 2007. Determining membrane protein structures: still a challenge! *Trends Biochem. Sci.* 32: 259-270. [R]

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 247-296. [R]

Singer, S. J. and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731. [P]

Tamm, L. K., A. Arora and J. H. Kleinschmidt. 2001. Structure and assembly of β-barrel membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 276: 32399-32402. [R]

Towler, D. A., J. I. Gordon, S. P. Adams and L. Glaser. 1988. The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 69-99. [R]

White, S. H., A. S. Ladokhin, S. Jayasinghe and K. Hristova. 2001. How membranes shape protein structure. *J. Biol. Chem.* 276: 32395-32398. [R]

Zhang, F. L. and P. J. Casey. 1996. Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 241-269. [R]

BÖLÜM 3

Biyoenerjetik ve Metabolizma

Metabolik Enerji ve ATP 81

Elektron Taşınımı ve Oksidatif Fosforilasyon 89

Fotosentez 95

Hücre Bileşenlerinin Biyosentezi 101

Anahtar Deney
Kemiozmatik Teori 93

Anahtar Deney
Antimetabolitler ve Kemoterapi 105

Hücrenin gerçekleştirmesi gereken birçok iş, örneğin, hareket membran transportu ve makromoleküllerin sentezi enerji gerektirmektedir. Dolayısıyla, metabolik enerjinin üretimi ve kullanımı hücre biyolojisinin temelini oluşturur. Hücrelerin tümü metabolik enerji kaynağı olarak ATP kullanır ve hücrelerin ATP üretimi için kullandıkları, organik moleküllerin yıkımı ya da fotosentez gibi mekanizmalar bu bölümde ele alınmıştır. Buna ek olarak, hücre metabolizmasını oluşturan ve karbohidrat, lipid ve nükleik asitler gibi temel hücre bileşenlerinin sentezinden sorumlu olan kimyasal reaksiyonlar ağı da bu bölümde sunulmuştur.

Metabolik Enerji ve ATP

Enerji, hücrenin gerçekleştirdiği işler için temel gereksinimdir; dolayısıyla, hücresel aktivitelerin bir çoğu çevreden enerji elde etmeye ve bu enerjiyi enerji gerektiren tepkimelerde kullanmaya odaklanır. Bir önceki bölümde tartışıldığı gibi, hücrelerdeki hemen tüm kimyasal reaksiyonların hızları enzimler tarafından kontrol edilir; böylece enzimler, canlı hücrelerin ılımlı koşullarında hangi reaksiyonların yer alacağını belirlerler. Ancak, enzimler yalnızca reaksiyon hızlarını kontrol ederler; kimyasal reaksiyonların denge durumları enzimatik katalizden etkilenmez. Kimyasal dengeleri daha ziyade termodinamik yasaları yönetir ve tüm kimyasal reaksiyonların enerjetik yönden elverişli olan yönlerini belirler. Hücrelerde yer alan reaksiyonların birçoğu enerjetik yönden elverişli olmayıp, sadece ek enerji girişi ile ilerleyebilmektedir. Dolayısıyla, hücreler sürekli olarak çevreden ürettikleri enerjiyi oluşturmak ve harcamak zorundadırlar.

Serbest enerji ve ATP

Biyokimyasal reaksiyonların enerjetiği, en iyi tanımlayan terim adını, Josiah Willard Gibbs'den alan **Gibbs serbest enerjisi** *(G)* olarak adlandırılmış termodinamik fonksiyondur. Bir reaksiyonun serbest enerji değişimi (ΔG), entalpi (kimyasal reaksiyon sırasında serbestleşen ya da absorblanan ısı) ile entropi (bir reaksiyon sonucunda ortaya çıkan düzensizlik derecesi) değişikliklerinin etkilerini birleştirerek, bir reaksiyonun enerjetik olarak uygun olup olmadığını öngörmektedir. Tüm kimyasal reaksiyonlar, enerjetik olarak uygun yönde, serbest enerjideki azalma ile birlikte ($\Delta G < 0$) kendiliğinden gerçekleşir. Örneğin, A'nın B'ye dönüştüğü hipotetik bir reaksiyon incelendiğinde:

$$A \rightleftharpoons B$$

$\Delta G<0$ ise reaksiyon gösterildiği şekilde, ileriye doğru gerçekleşecektir. $\Delta G>0$ ise, reaksiyon ters yönde ilerleyecek ve B, A'ya dönüştürülecektir.

Bir reaksiyonun ΔG'si yalnızca reaktantların ve ürünlerin içsel özellikleri ile değil, aynı zamanda konsantrasyonları ve diğer reaksiyon koşulları ile de (örn., sıcaklık) belirlenmektedir. Dolayısıyla, bir reaksiyonun serbest-enerji değişimini standart koşullarda tanımlamak yararlıdır (Standart koşullar, tüm reaktant ve ürünlerin 1-*M* konsantrasyonları ve 1 atm basınç olarak düşünülür). Bir reaksiyonun standart serbest enerji değişimi ($\Delta G°$) denge durumu ile doğrudan ilişkilidir, çünkü gerçek ΔG, hem $\Delta G°$'nin, hem de reaktant ve ürünlerin konsantrasyonlarına bağlıdır. Örneğin,

$$A \rightleftharpoons B$$

reaksiyonunda, serbest enerji değişimi aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln [B] / [A]$$

burada R gaz sabitesi ve T mutlak sıcaklıktır.

Denge durumunda, $\Delta G = 0$'dır ve reaksiyon hiçbir yönde ilerlemez, ($K = [B] / [A]$, denge halinde) yukarıdaki denkleme göre doğrudan $\Delta G°$ ile ilişkili olup, şu şekilde ifade edilebilir:

$$0 = \Delta G° + RT \ln K$$

ya da,

$$\Delta G° = - RT \ln K$$

Eğer gerçek oran, [B]/[A], denge oranı (K)'dan büyük ise, $\Delta G>0$ olup, reaksiyon ters yönde, (B'nin A'ya dönüşümü) ilerler. Diğer taraftan, eğer [B] / [A] oranı denge oranından küçük ise, $\Delta G<0$ olup, A, B'ye dönüşür.

Bu nedenle bir reaksiyonun standart serbest-enerji değişimi ($\Delta G°$), kimyasal dengesini belirler ve herhangi bir dizi koşul altında, reaksiyonun hangi yönde ilerleyeceğini öngörür. Biyokimyasal reaksiyonlar için, standart serbest-enerji değişimi genelde, $\Delta G°'$ şeklinde gösterilmektedir. Bu hücre içindeki koşullara yakın olup, pH = 7 olan sulu bir çözeltinin standart serbest-enerji değişimidir.

Birçok biyolojik reaksiyon (örn., makromoleküllerin sentezi) hücresel koşullarda, termodinamik olarak elverişli değildir ($\Delta G>0$). Bu reaksiyonların ilerleyebilmesi için ilave bir enerji kaynağına gereksinim vardır. Örneğin, şu reaksiyonu ele alınız:

$$A \rightleftharpoons B \ \Delta G = + 10 \text{ kcal / mol}$$

A'nın B'ye dönüşümü enerjetik yönden elverişli değildir, reaksiyon ileri yönde değil, ters yönde ilerler. Ancak, A'nın B'ye dönüşümü enerjetik olarak elverişli bir başka reaksiyon ile kenetlendiğinde reaksiyon ileri yönde gerçekleşir:

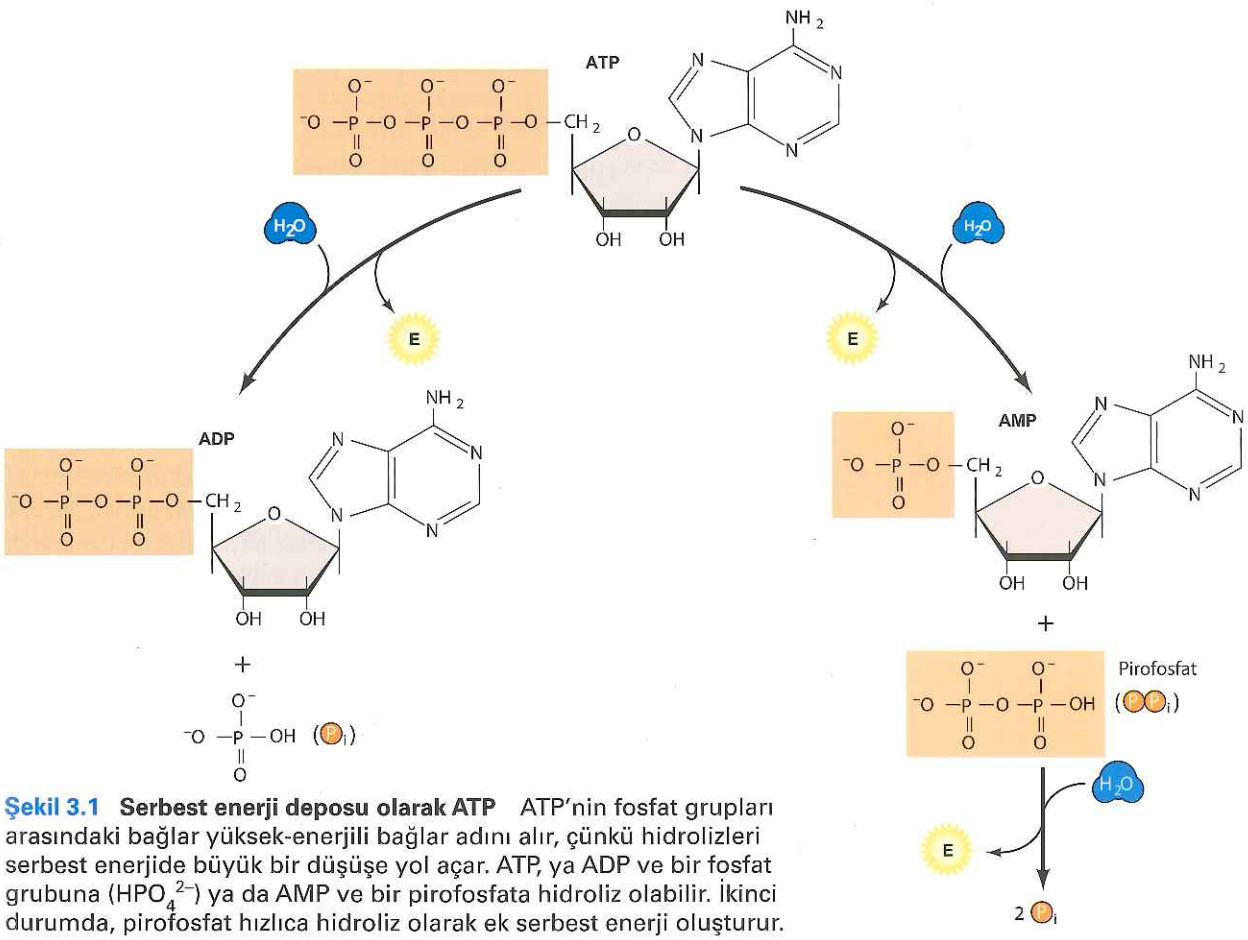
$$C \rightleftharpoons D, \ \Delta G = -20 \text{ kcal / mol}$$

Bu iki reaksiyon birleştiğinde, kenetlenmiş reaksiyon aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$A + C \rightleftharpoons B + D, \ \Delta G = -10 \text{ kcal / mol}$$

Birleşmiş reaksiyonun ΔG'si, her bir bileşenin ayrı ayrı serbest-enerji değişiminin toplamıdır. Böylece, kenetlenmiş reaksiyon enerjetik olarak elverişli olup, yazıldığı gibi ilerleyecektir. Dolayısıyla, A'nın B'ye enerjetik yönden elverişsiz olan dönüşümü, büyük bir serbest enerji düşüşü gösteren ikinci bir reaksiyon ile kenetlenerek olanaklı hale getirilmiştir. Enzimler, bu tür kenetlenmiş reaksiyonların eşgüdümlü olarak yürütülmesinden sorumludur.

Hücre, bu temel mekanizmayı, biyolojik sistemlerde yer alması gereken çok sayıda, enerjetik yönden elverişsiz reaksiyonları yürütmek için kullanır. **Adenozin 5′-trifosfat (ATP)**, hücrede serbest enerji deposu olarak görev alarak, bu süreçte merkezi bir rol oynar (Şekil 3.1). ATP'nin fosfat grupları arasındaki bağlar **yüksek-enerjili bağlar** olarak bilinirler, çünkü hidrolizleri, serbest enerjide göreceli büyük bir düşüş ile birlikte seyreder. Kimyasal bağların kendileri özel bağlar değildir; onların yüksek-enerjili bağlar olarak bilinmesi, hücre içinde hidroliz olduklarında büyük miktarda serbest enerjinin ortaya çıkması nedeniyledir. ATP'nin ADP + fosfata (P_i) hidrolizinde, $\Delta G^{\circ\prime} = -7.3$ kcal /mol'dür. $\Delta G^{\circ\prime}$ 'nin, "Standard koşullara" ait olduğunu ve tüm reaktantların ve ürünlerin 1*M* olduğunu unutmayınız. P_i'nin gerçek hücre içi konsantrasyonları 10^{-2} *M* dolaylarındadır ve ATP'nin hücre içi konsantrasyonları, ADP'ninkinden



Şekil 3.1 Serbest enerji deposu olarak ATP ATP'nin fosfat grupları arasındaki bağlar yüksek-enerjili bağlar adını alır, çünkü hidrolizleri serbest enerjide büyük bir düşüşe yol açar. ATP, ya ADP ve bir fosfat grubuna (HPO_4^{2-}) ya da AMP ve bir pirofosfata hidroliz olabilir. İkinci durumda, pirofosfat hızlıca hidroliz olarak ek serbest enerji oluşturur.

daha yüksektir. Hücre içi konsantrasyonlar ile standart koşullar arasındaki bu farklılıklar, ATP hidrolizi lehine çalışmakta ve ATP'nin hücre içinde hidrolizi için, ΔG -12 kcal / mol civarında olmaktadır.

Alternatif olarak, ATP, AMP ile pirofosfata (PP_i) hidroliz edilebilir. Bu reaksiyon, ATP'nin ADP'ye hidrolizinde açığa çıkan kadar bir serbest enerji miktarını açığa çıkarır. Ancak, bu reaksiyonda üretilen pirofosfatın kendisi, ATP hidrolizindekine benzer bir ΔG ile hızlıca hidroliz olur. Böylece, ATP'nin AMP'ye hidroliz edilmesinde açığa çıkan toplam serbest enerji miktarı, ATP'nin ADP'ye hidrolizinde açığa çıkanın iki katı dolayındadır. Kıyaslamak amacıyla, AMP'de şeker ile fosfat arasındaki bağ, yüksek enerjili olmayıp kovalent bağ özelliğindedir; AMP'nin hidrolizinde $\Delta G^{\circ\prime}$ = -3.3 kcal / mol'dür.

ATP hidrolizi, serbest enerjideki birlikte seyreden düşüş nedeni ile, hücrede diğer enerji gerektiren reaksiyonların yürütülmesi için kullanılabilir. Örneğin, glikolizdeki birinci reaksiyon (bir sonraki kısımda tartışılmıştır) glukozun glukoz-6-fosfata dönüşümüdür. Reaksiyon şu şekilde yazılabilir:

$$\text{Glukoz} + \text{Fosfat } (HPO_4^{2-}) \rightarrow \text{Glukoz-6-fosfat} + H_2O$$

Reaksiyon bu şekilde yazıldığında, enerjetik yönden elverişsiz ($\Delta G^{\circ\prime}$ = +3.3 kcal/mol) olduğundan, ileri yönde yürümesi için ATP hidrolizine ($AG^{\circ\prime}$ = -7.3 kcal/mol) kenetlenmesi gerekmektedir:

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + HPO_4^{2-}$$

Birleşik reaksiyon aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$\text{Glukoz} + ATP \rightarrow \text{Glukoz-6-fosfat} + ADP$$

Bu reaksiyon için serbest enerji değişimi, tek tek reaksiyonların serbest-enerji değişimlerinin toplamıdır; böylece, kenetlenmiş reaksiyon için $\Delta G^{\circ\prime}$ = -4.0 kcal/mol olup, glukoz-6-fosfat oluşumu lehinedir.

Aralarında nükleozid trifosfatların (örn., guanozin, 5′-trifosfat, GTP) da bulunduğu bazı diğer moleküllerde de yüksek-enerjili bağlar mevcut olup, enerji gerektiren reaksiyonlarda ATP gibi kullanılabilirler. Ancak, reaksiyonların çoğunluğunda serbest enerjiyi sağlayan molekül ATP'dir. Dolayısıyla, hücre içinde enerji üreten reaksiyonlar ATP sentezi ile, enerji gerektirenler ise ATP hidrolizi ile kenetlenmiştir. Bu yüzden ATP'nin yüksek-enerjili bağları, serbest enerjinin kullanılabilir depo formunu oluşturarak hücre metabolizmasında merkezi bir rol oynamaktadır. ATP'nin hidrolizi, moleküllerin konsantrasyon gradient ters yönünde enerji gerektiren taşımalarını (aktif taşıma, bkz. 2.38), kas kasılması ve mitoz sırasında kromozomların ilerlemesi gibi hücre hareketlerini destekler (13. Bölümde ele alınmıştır).

Glikoliz ve Krebs döngüsü

Karbohidratların ve özellikle glukozun yıkılması hücresel enerjinin temel kaynağıdır. Glukozun CO_2 ve H_2O'ya tam oksidasyonu aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O$$

Reaksiyon, büyük miktarda serbest enerji açığa çıkarır: $AG^{\circ\prime}$ = -686 kcal / mol. Bu serbest enerjiyi kullanılabilir formunda tutabilmek için, glukoz, hücrelerde ATP sentezine kenetlenen bir dizi reaksiyonla yükseltgenir.

Animasyon 3.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a3.1
Glikoliz Glukozun yıkılmasındaki ilk basamak olup, iki molekül piruvat ve net iki molekül ATP'nin oluşumu ile sonuçlanır.

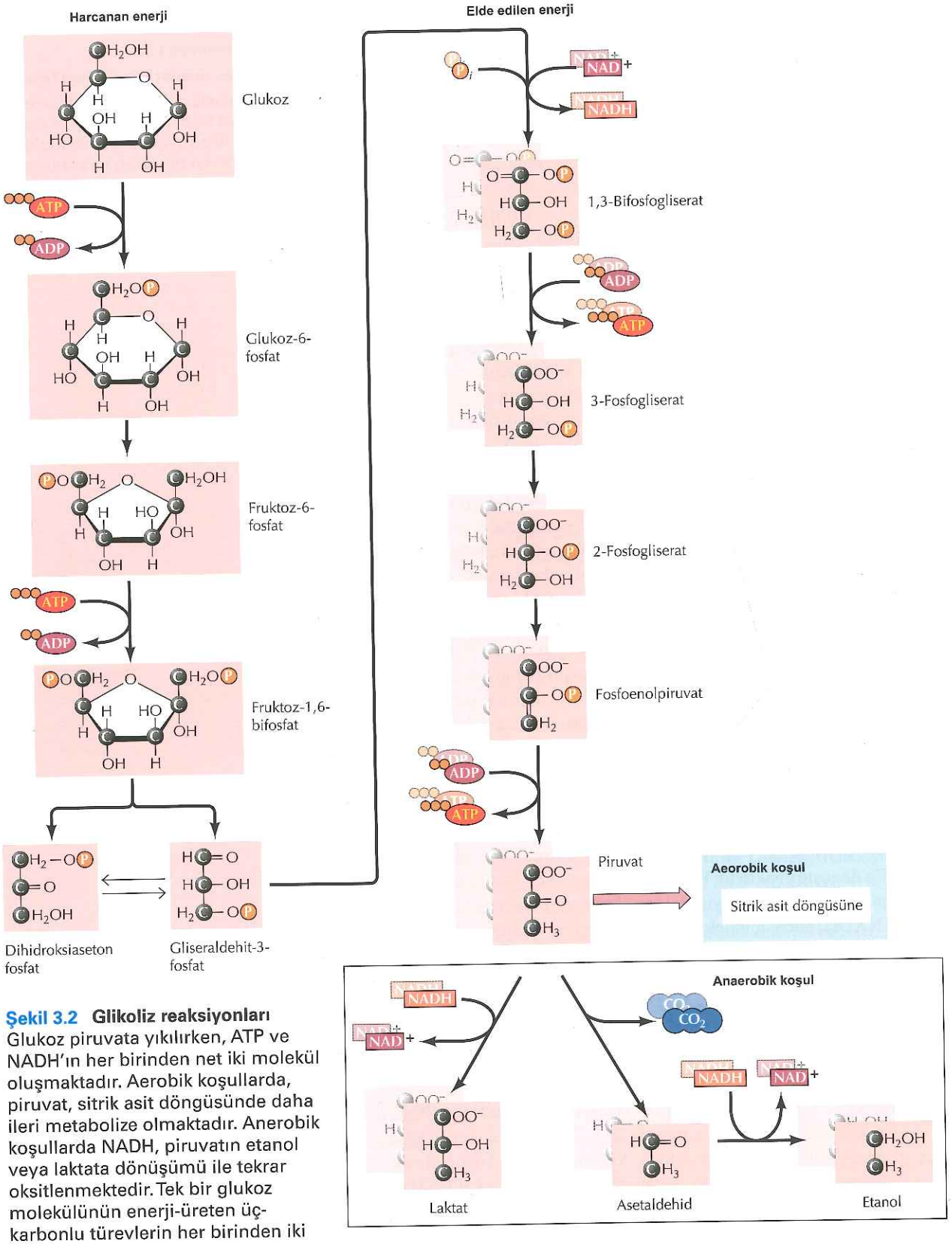
Glikoliz glukoz yıkılımında ilk evre olup hemen tüm hücrelerde görülür. Glikoliz oksijen yokluğunda gerçekleşir ve de anaerobik organizmaların tüm metabolik enerjisini sağlar. Ancak, aerobik hücrelerde glikoliz glukoz yıkılımındaki sadece ilk evredir.

Glikoliz reaksiyonlarında glukozun piruvata yıkılımı, iki net ATP üretimi ile sonuçlanır (**Şekil 3.2**). Metabolik yoldaki ilk reaksiyonlar gerçekte enerji gerektirir; glukozun glukoz-6-fosfata ve daha sonra fruktoz-6-fosfatın fruktoz-1, 6-bisfosfata fosforillenmesi için ATP kullanılır. Bu iki reaksiyonu katalizleyen enzimler –sırasıyla, heksokinaz ve fosfofruktokinaz– glikolitik yolun önemli kontrol noktalarıdır. Anahtar kontrol elemanı fosfofruktokinaz olup, yüksek ATP düzeylerinde inhibe olmaktadır. Fosfofruktokinazın inhibisyonu glukoz-6-fosfatın birikmesine neden olmakta ve bu da, heksokinazı inhibe etmektedir. Böylece, hücrede yeterince ATP formunda enerji kaynağı varsa, glukozun yıkılımı durdurulmaktadır.

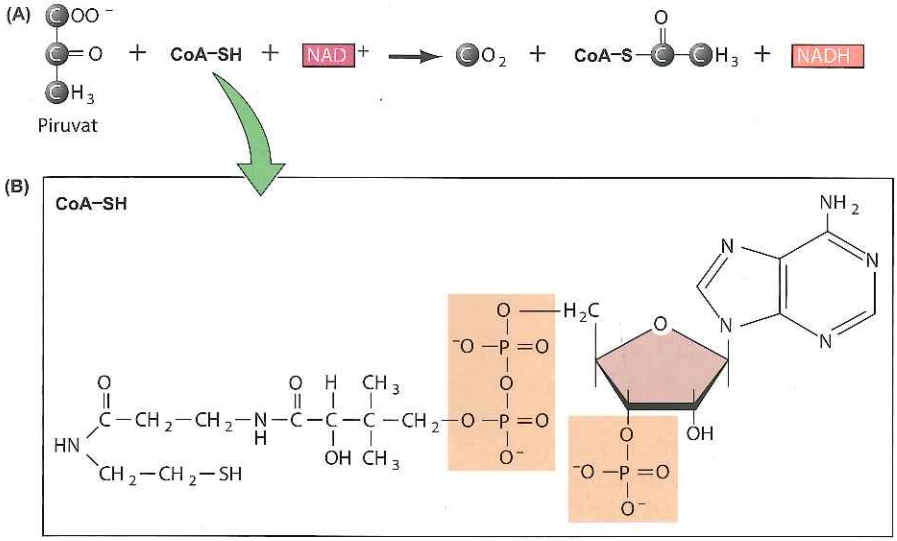
Fruktoz-1, 6-bifosfatın üretimini izleyen reaksiyonlar glikolitik dizinin enerji üreten bölümünü oluşturmaktadır. Fruktoz-1,6-bisfosfatın parçalanması, iki adet üç-karbonlu bir şeker olan gliseraldehid-3-fosfatı oluşturmakta, bu da 1,3-bisfosfogliserata yükseltgenmektedir. Bu bileşiğin fosfat grubu hidroliz edildiğinde, çok yüksek miktarda serbest enerji açığa çıktığından ($\Delta G^{\circ\prime}$ = -11.5 kcal / mol), bu enerji glikolizin bir sonraki reaksiyonunda ADP'den ATP sentezi için kullanılmaktadır. Bu reaksiyonun ürünü olan 3-fosfogliserat, daha sonra, glikolizde ikinci yüksek enerjili ara bileşik olan fosfoenolpiruvata dönüşmektedir. Fosfoenolpiruvatın yüksek enerjili fosfat grubunun ($\Delta G^{\circ\prime}$ = -14.6 kcal / mol) hidroliz edilerek piruvata dönüşümü, ATP sentezi ile kenetlenmiştir. Her bir gliseraldehid-3-fosfat molekülünün piruvata dönüşümü, iki adet ATP molekülünün oluşumu ile kenetlenmiştir. Toplamda başlangıçtaki her bir glukoz molekülünden dört adet ATP sentezlenir. İlk iki adet ATP harcandığından, glikolizde net kazanım iki ATP molekülüdür.

ATP üretiminin yanı sıra, glikoliz, iki molekül NAD^+ koenzimini NADH'a dönüştürmektedir. Bu reaksiyonda, NAD^+ gliseraldehid-3- fosfattan elektronları alan yükseltgeyici faktör olarak görev yapmaktadır. Ürün olarak oluşan NADH, hücre içindeki diğer yükseltgeme-indirgeme reaksiyonlarında elektron verici olarak kullanılarak, NAD^+'ye geri dönüşmektedir. Anaerobik koşullarda, glikoliz sırasında üretilen NADH, piruvatın laktata veya etanole dönüşümü sırasında NAD^+'ye tekrar yükseltgenmektedir. Ancak aerobik organizmalarda, NADH, elektronlarını elektron taşıma zincirine vererek ek bir enerji kaynağı sağlar. Bu elektronlar sonuçta O_2'nin H_2O'ya indirgenmesini sağlayarak, ilave ATP'nin oluşumu ile kenetlenir.

Ökaryotik hücrelerde, glikoliz sitozolde gerçekleşir. Piruvat daha sonra mitokondriye taşınır ve burada CO_2 ve H_2O'ya tam yükseltgenmesi ile, glukoz yıkılımından elde edilen ATP'nin büyük kısmı oluşur. Piruvat metabolizmasında bir sonraki basamak, **koenzim A (CoA-SH)** eşliğinde oksidatif dekarboksilasyonudur. CoA, çeşitli metabolik reaksiyonlarda açil grup taşıyıcısı olarak görev yapmaktadır (**Şekil 3.3**) Piruvatın karbonlarından



Şekil 3.2 Glikoliz reaksiyonları Glukoz piruvata yıkılırken, ATP ve NADH'ın her birinden net iki molekül oluşmaktadır. Aerobik koşullarda, piruvat, sitrik asit döngüsünde daha ileri metabolize olmaktadır. Anerobik koşullarda NADH, piruvatın etanol veya laktata dönüşümü ile tekrar oksitlenmektedir. Tek bir glukoz molekülünün enerji-üreten üç-karbonlu türevlerin her birinden iki adet oluşturduğuna dikkat ediniz.



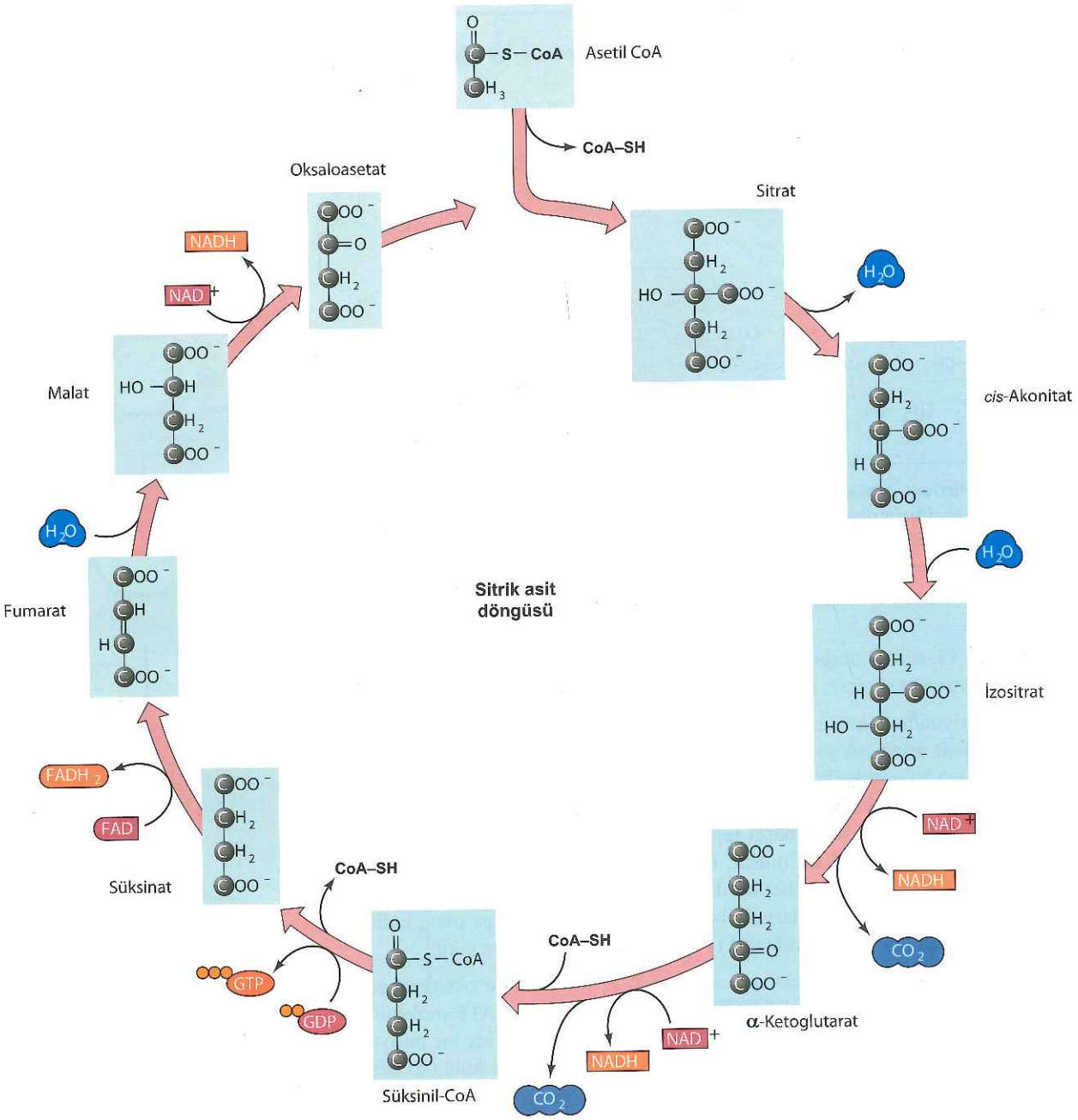
Şekil 3.3 Pirüvatın oksidatif dekarboksilasyonu (A) Piruvat, CO_2 ve asetil CoA'ya dönüşmekte ve bu olay sırasında bir adet NADH molekülü oluşmaktadır. (B) Koenzim A (CoA-SH), çok çeşitli reaksiyonlarda aktif açil gruplarının genel taşıyıcısıdır.

bir tanesi, CO_2 olarak serbestleşir ve diğer ikisi de CoA'ya eklenerek asetil CoA oluşturur. Bu süreçte, bir NAD^+ molekülü NADH'a indirgenir.

Bu reaksiyonda oluşan asetil CoA, oksidatif metabolizmanın merkezi yolu olan **sitrik asit döngüsü** ya da, **Krebs döngüsü**'ne girer (**Şekil 3.4**). İki karbonlu asetil grubu dört karbonlu oksaloasetat ile birleşerek altı karbonlu sitratı oluşturur. Daha sonraki sekiz reaksiyon ile, sitratın iki karbon atomu CO_2'e tam olarak oksitlenir ve oksaloaset rejenere edilir. Döngü sırasında, GTP'de bir yüksek-enerjili fosfat bağı oluşur, bu da, bir ATP molekülünün sentezini sağlar. İlave olarak, döngünün her bir dönüşünde üç NADH molekülü ve yükseltgeme-indirgeme reaksiyonlarında bir başka elektron taşıyıcısı olan, indirgenmiş bir **flavin adenin dinükleotid ($FADH_2$)** molekülü ortaya çıkar.

Sitrik asit döngüsünde, glukozun altı adet CO_2 molekülüne oksitlenmesi tamamlanır. Her bir glukoz molekülünden, doğrudan dört adet ATP molekülü elde edilir-ikisi glikolizden ve ikisi de sitrik asit döngüsünden (her bir piruvat molekülünden birer adet). Buna ilave olarak, on adet NADH molekülü (iki adet glikolizden, iki adet pirüvatın asetil CoA'ya dönüşümünden ve altı adet sitrik asit döngüsünden) ile iki adet $FADH_2$ molekülü oluşmaktadır. Glukozun yıkılımından elde edilen enerjinin geri kalan bölümü, NADH ve $FADH_2$'ın yeniden yükseltmeleri ile kazanılır: elektronları elektron taşıma zincirine aktarılır ve (sonunda) O_2'i H_2O'ya indirgemede kullanılır. Bu bölümün bir sonraki konusunda ele alındığı gibi NADH'ın yükseltgenmesi üç molekül ATP, $FADH_2$'nin yükseltgenmesi ise iki molekül ATP'nin sentezini sağlayacak düzeyde enerji açığa çıkarır. Glukozun tam olarak yükseltgenmesi 38 ATP molekülünü oluşturur (4'ü doğrudan glikoliz ve sitrik asit döngüsünden, 30'u NADH'ın yükseltgenmesinden ve 4'ü de, $FADH_2$'nin yükseltgenmesinden). Ancak, bu verim bazı hücrelerde daha düşüktür, çünkü glikolizden sitozolde elde edilen iki NADH molekülü mitokondriye doğrudan girememektedir. Bunun yerine, elektronların mitokondriye

Animasyon 3.2
sites.sinauer.com/cooper7e/a3.2
Sitrik Asit Döngüsü Glukozun, oksidatif metabolizmasında merkezi yoldur ve altı adet karbondioksit molekülüne oksitlenmesini tamamlanır.



Şekil 3.4 Sitrik asit döngüsü İki-karbonlu bir asetil grubu, asetil CoA' dan oksaloasetata taşınarak sitrat oluşturulur. Sonra, sitratın iki karbonu CO_2'e oksitlenir ve oksaloasetat yeniden elde edilir. Döngünün her bir dönüşü bir adet GTP molekülü, üç NADH ve bir $FADH_2$ üretir.

bir mekik sistemi ile transfer edilmesi gerekmektedir. Kullanılan sisteme bağlı olarak, bu aktarımda, elektronların elektron taşıma zincirine $FADH_2$ düzeyinde girmeleri söz konusu olabilir. Bu durumlarda, glikolizden elde edilen iki NADH molekülü, üç yerine iki ATP molekülü oluşumu ile sonuçlanır ki, glukoz molekülü başına toplam ATP eldesi 38 yerine 36 olur.

Lipidlerden enerji elde edilmesi

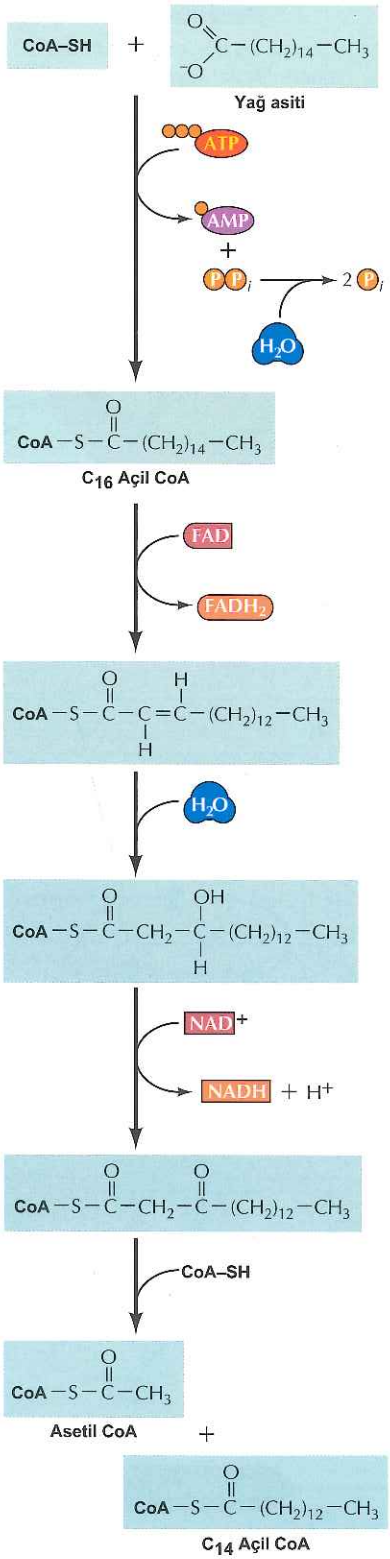
ATP formundaki enerji, sadece glukozun yıkılımından değil, başka organik moleküllerin yıkılımından da elde edilebilir; glikoliz ve sitrik asit döngüleri, burada da merkezi rol oynar. Hücrelerdeki iki temel enerji deposunu oluşturan polisakkaridler ve lipidler de ATP üretmek üzere yıkılabilirler. Polisakkaridler serbest şekerlere yıkılırlar, bunlar da önceki başlıkta ele alındığı gibi glikoliz ve Krebs döngüsüyle metabolize olurlar. Lipidler ise, daha da verimli enerji depo molekülleridir. Temelde hidrokarbon zincirlerinden oluşmuş olan lipidler, karbohidratlara göre daha indirgenmiş olduklarından, yükseltgenmeleri, başlangıç materyali ağırlığı başına çok daha fazla enerji açığa çıkartır.

Yağlar (triaçilgliseroller) lipidlerin temel depo formlarıdır. Kullanımlarında ilk basamak, gliserol ve yağ asitlerine yıkılmalarıdır. Her bir yağ asiti, bir molekül ATP harcayarak koenzim A'ya bağlanır ve açil-CoA oluşturur (**Şekil 3.5**). Daha sonra, yağ asitleri basamaklı bir oksidatif süreç ile, her defasında iki karbon olmak üzere yıkılarak asetil CoA ile iki karbon birimi eksik açil-CoA üretir. Her bir oksidasyonda, aynı zamanda bir NADH ve bir $FADH_2$ molekülü ortaya çıkar. Daha sonra asetil CoA sitrik asit döngüsüne girer ve yağ asitinin kalan bölümünün yıkılması benzer biçimde sürer.

Böylece, 16-karbonluk bir yağ asitinin yıkılması yedi NADH molekülü, yedi $FADH_2$ molekülü ve sekiz asetil CoA molekülü oluşturur. ATP üretimi yönünden bilanço: NADH'dan elde edilen 21 ATP molekülü (3 x 7), FADH'den 14 ATP (2 x 7) ve asetil CoA'dan 96 (8 x 12) ATP'dir. Reaksiyonların başlangıcında bir adet ATP harcanmış olduğundan, net kazanç, 16-karbonlu bir yağ asiti için 130 ATP'dir. Bunun verimi ile, bir molekül glukozdan elde edilen net 38 ATP'yi karşılaştırınız. Doymuş bir onaltı-karbonlu yağ asitinin molekül ağırlığı 256, glukozunki ise 180 olduğundan, ATP üretimi gram yağ asiti başına, 2.5 kat daha fazladır- bu da lipidlerin (yağların) depo molekülleri olarak polisakkaridlere (şekerlere) üstünlüğünü gösterir.

Elektron Taşınımı ve Oksidatif Fosforilasyon

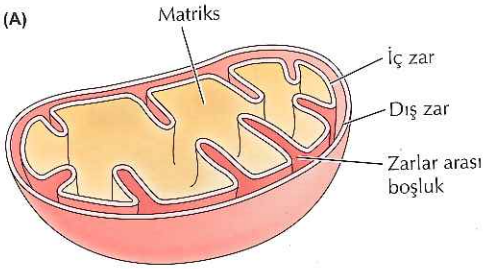
Karbohidrat ya da yağların yıkılmasından elde edilen kullanılabilir enerjinin çoğunluğu elektron taşınımı ve oksidatif fosforilasyon yolu ile sağlanır. Örneğin, glukozun glikoliz ve sitrik asit yolları ile yıkılması ile toplam dört adet ATP molekülü, on adet NADH molekülü ve iki adet $FADH_2$ molekülü üretir. NADH ve $FADH_2$ den açığa çıkan elektronların moleküler oksijene aktarılmaları, ilave 34 adet ATP molekülünün oksidatif fosforilasyon ile oluşumuna kenetlenmiştir. Elektronların NADH'dan O_2'ye transferi büyük miktarda serbest enerji açığa çıkarır: transfer edilen her bir elektron çifti için $\Delta G^{\circ\prime} = -52.5$ kcal / mol. Bu enerjinin kullanılabilir formda kazanılabilmesi için, bu süreç elektronların aşamalı olarak, elektron taşıma zincirini oluşturan bir dizi taşıyıcıdan geçirilmesi ile gerçekleşir.

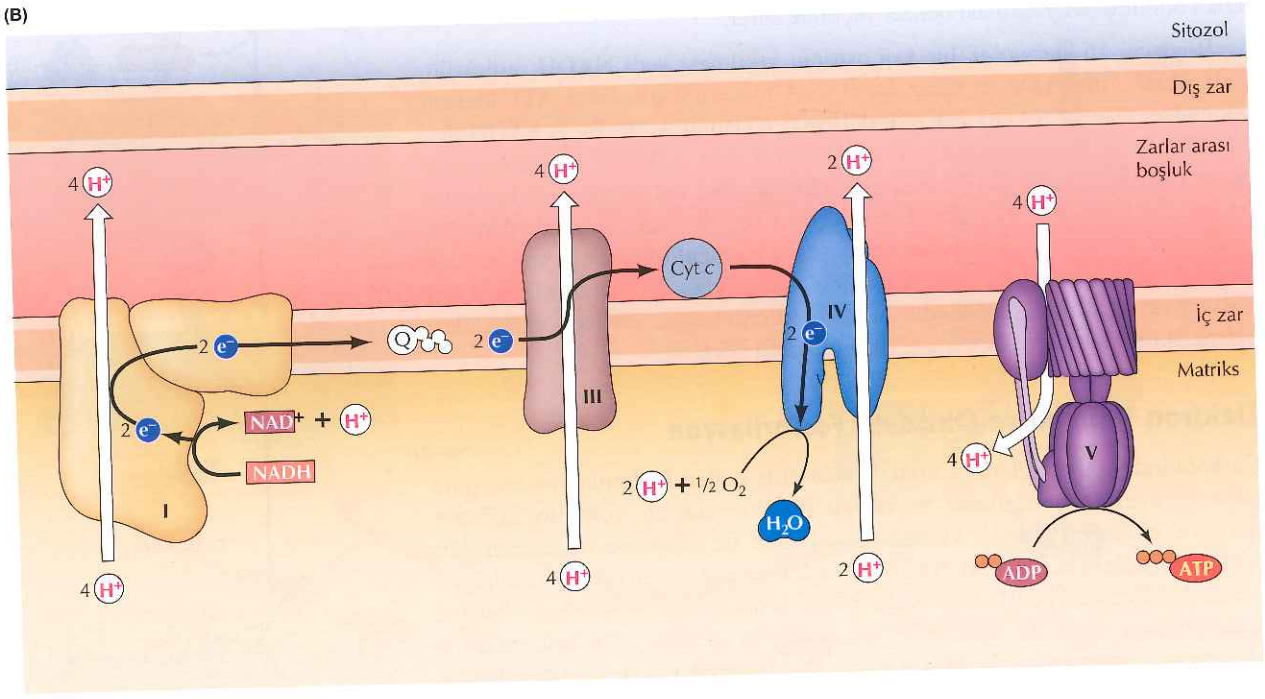


Şekil 3.5 Yağ asiti oksidasyonu Yağ asiti (örn., 16 karbonlu doymuş yağ asiti Palmitat gibi), başlangıçta bir molekül ATP harcayarak koenzim A'ya (CoA-SH) bağlanır. Daha sonra, yağ asiti yıkılımı basamaklı bir oksidatif süreç ile (NADH ve $FADH_2$ oluşumu ile kilitlenmiş), asetil CoA'da olduğu gibi her defasında iki karbon ayrılarak, ilerler.

Elektron taşıma zinciri

Elektron taşıma zincirinin bileşenleri, aerobik bakterilerin plazma zarlarında ve ökaryotik hücrelerin iç mitokondri zarlarında dört adet kompleks olarak düzenlenmişlerdir (**Şekil 3.6**). NADH, mitokondri matriksinde sitrik asit döngüsünde oluşur. NADH'ın elektronları, elektron taşıma zincirine, ökaryotik hücrelerde 44 polipeptid zincirinden oluşan kompleks I üzerinden girerler. Bu elektronlar, önce NADH'dan flavin mononükleotidine taşınırlar ve daha sonra, bir dizi demir-kükürt taşıyıcıları ile, enerji açığa çıkaran bir reaksiyon ile ($\Delta G^{\circ\prime}$ = -16.6 kcal / mol) koenzim Q'ya taşınırlar. **Koenzim Q (übikinon** da denir) küçük, lipidde çözünür bir molekül olup elektronları zar boyunca kompleks I'den, on adet polipeptidden oluşan komleks III'e taşır. Kompleks III'de elektronlar enerji açığa çıkaran bir reaksiyon ile ($\Delta G^{\circ\prime}$ = -10.1 kcal / mol) sitokrom *b*'den sitokrom c'ye taşınır. **Sitokrom *c*,** elektronları son olarak O_2'e





Şekil 3.6 Mitokondride elektron taşıma zinciri (A) Mitokondriler iç ve dış zarlardan oluşan bir çift-zar sistemiyle sınırlanmıştır. İç zarın kıvrımları (krista) matriksin içine doğru uzanır. NADH, mitokondri matriksinde Krebs döngüsünde oluşur. (B) NADH ile gelen elektronlar, elektron taşıma zincirine kompleks I'den girer. Bu elektronlar daha sonra koenzim Q aracılığıyla komplex III'e aktarılır ve son olarak sitokrom *c* tarafından, O_2'e aktarılacakları yer olan komplex IV'e taşınır. Kompleks I, III ve IV'deki elektron aktarımında serbest enerjide düşüş olur ve bu da protonların matriksten zarlar arası boşluğa pompalanmasında kullanılır. Sonuçta iç zarın iki yanında bir proton gradienti oluşur. Proton gradientinde saklanan enerji, protonların kompleks V içerisinden matrikse geri dönüşü sırasında ATP sentezini gerçekleştirmek için kullanılır.

Bilgi İçin

Rotenon, kompleks I'den koenzim Q'ya elektron taşınımının inhibitörüdür. Geniş spektrumlu bir insektisit olarak kullanılır.

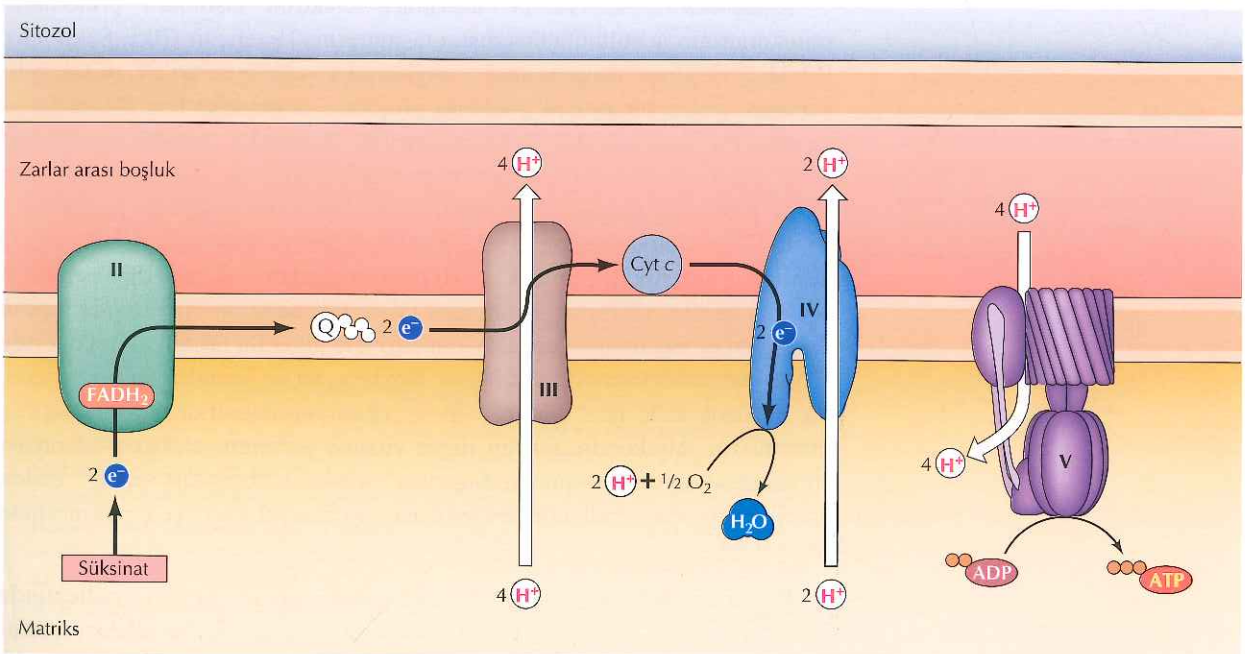
aktaracak olan kompleks IV'e (**sitokrom oksidaz**) taşır ($\Delta G^{\circ\prime}$ = -25.8 kcal / mol). Bu komplekslerin her birindeki enerji açığa çıkaran elektron transferleri, ATP sentezine kenetlenmiştir.

Dört polipeptidden oluşan farklı bir protein kompleksi (kompleks II), elektronları bir sitrik asit döngüsü ara ürünü olan süksinattan alır (**Şekil 3.7**). Bu elektronlar NADH'ya değil $FADH_2$'ye ve daha sonra koenzim Q'ya aktarılır. Daha önce anlatıldığı gibi, elektronlar koenzim Q'dan kompleks III'e ve daha sonra kompleks IV'e aktarılırlar. Kompleks I'de elektronların NADH'dan koenzim Q'ya aktarılmasının aksine, elektronların $FADH_2$'den koenzim Q'ya aktarımı serbest enerjide önemli bir düşmeye neden olmaz. Bu nedenle de ATP sentezi ile kenetlenmemiştir. Sonuç olarak $FADH_2$'den kaynaklanan elektronların elektron taşıma zincirinden geçişi sırasında sadece kompleks III ve IV'de serbest enerji elde edilir.

Elektronların kompleks I, III ve IV'den geçirilmesinden elde edilen serbest enerji, **oksidatif fosforilasyon** yolu ile, ATP sentezini ilerletir. Elektron taşınma reaksiyonlarından çıkan enerjinin ATP senteziyle eşlenme mekanizması, glikoliz ya da sitrik asit döngüsü sırasındaki ATP sentezinden temel olarak farklıdır. Bu son durumda, yüksek enerjili bir fosfat ADP'ye diğer bir substrattan enerji-üreten bir reaksiyonla aktarılır. Örneğin glikolizin son tepkimesinde fosfoenolpiruvat'ın yüksek enerjili fosfatı ADP'ye aktarılarak piruvat ve ATP elde edilir (bkz. Şekil 3.2). Bu şekilde yüksek enerjili fosfat gruplarının direkt aktarımı oksidatif fosforilasyon sürecinde görülmez. Bunun yerine, elektronun taşınması sırasında çıkan enerji iç mitokondri zarının iki

Bilgi İçin

Elektron taşıma rolüne ek olarak, sitokrom *c*, memeli hücrelerinde programlanmış hücre ölümünün önemli bir düzenleyicisidir (bkz. Bölüm 18).



Şekil 3.7 $FADH_2$'den elektron taşınması
Süksinattan gelen elektronlar elektron taşıma zincirine $FADH_2$ aracılığıyla kompleks II'den girer. Daha sonra koenzim Q'ya aktarılırlar ve Şekil 3.6'da anlatıldığı şekilde, elektron taşıma zinciri boyunca taşınırlar. Elektronların $FADH_2$'den koenzim Q'ya aktarımı önemli bir serbest enerji düşmesine neden olmadığından, kompleks II'de zardan proton pompalanmaz ve serbest enerji sadece komplex III ve IV'de üretilir.

yanında (ya da bakteri plazma zarında) proton gradienti oluşumuyla eşlenir. Bu gradientte saklanan potansiyel enerji daha sonra, zardan enerjetik olarak elverişli proton geri akışıyla ATP ile kenetlenen beşinci protein kompleksi tarafından depolanır.

Kemiozmotik kenetlenme

Elektron taşınması ATP üretimiyle kenetleyen mekanizma, **kemiozmotik kenetlenme**, hücre biyolojisinde yapı ile işlev ilişkisinin çarpıcı bir örneğidir. Kemiozmotik kenetlenme hipotezi, ilk kez 1961'de Peter Mitchell tarafından öne sürülmüştür. Bu hipoteze göre ATP yüksek enerji grupların doğrudan kimyasal olarak aktarılması ile değil, biyolojik zarlar boyunca proton gradienti formunda tutulan potansiyel enerjinin kullanılmasıyla oluşturulduğunu öne sürer. Biyokimyacılar başlangıçta bu hipoteze şüpheyle yaklaştılar ve kemiozmotik hipotezin bilim camiasında kabul görmesi için on yıldan fazla bir süre geçti. Sonunda, çok yoğun destekleyen kanıtın birikmesiyle bugün kemiozmotik kenetlenme, sadece mitokondride ve bakteride değil, kloroplastlarda fotosentez sırasında da ATP üretimindeki genel bir mekanizma olarak benimsenmiştir. Kemiozmotik kenetlenmenin temel hipotezi şudur: küçük moleküllerin konsantrasyon gradientine karşı aktif taşınmasında sadece, ATP'den faydalanılabilir (bkz. Şekil 2.38). Reaksiyonun tersi yani küçük moleküllerin (protonlar gibi) enerji açısından elverişli taşınması, konsantrasyon gradientini aşağı çeker ve bu reaksiyon ATP sentezinin sürdürülmesinde kullanılabilir.

Kompleks I, III ve IV üzerinden elektron taşınması protonların mitokondrinin iç bölümünden dışarı taşınmasına kenetlenir (Bkz. Şekil 3.6). Böylece elektron taşınmasının enerji-üreten reaksiyonları iç mitokondri zarından geçen bir proton gradienti oluşturur. Kompleks I ve IV, elektron taşınımıyla uyarılan bir konformasyonel değişiklik sonucu, protonları zarın diğer yüzüne aktaran proton pompaları gibi davranırlar. Kompleks III'de protonlar zarın diğer yanına, protonları mitokondrideki kompleks I ya da II'den alarak kompleks III'de zarın diğer yüzüne bırakan, koenzim Q tarafından aktarılır. Kompleks I ve III her ikisi de, her elektron çifti başına dört protonu zardan aktarırlar. Kompleks IV'de her elektron çifti başına zardan iki proton pompalanır ve her elektron çifti için diğer iki proton, mitokondride H_2O oluşturmak üzere O_2 ile birleşir. Böylece, bu üç kompleksin her birinde, bir elektron çifti için dört proton eşdeğeri mitokondriden dışarı taşınır. Protonların mitokondri zarının diğer yüzüne aktarımı, elektron taşınması sürecindeki yükseltgenme/indirgenme reaksiyonlarından elde edilen enerjinin, proton gradientinde depolanan potansiyel enerjiye çevrilmesinde önemli rol oynar.

Protonlar elektrik yüklü partiküller olduklarından, proton gradientinde saklı potansiyel enerjinin biçimi kimyasal olduğu kadar elektrikseldir. Elektrik bileşeni, iç mitokondri zarının iki yanında, mitokondri içi negatif, dışı pozitif olacak şekilde, bir voltaj farklılığına neden olur. Bunun serbest enerji değeri

$$\Delta G = -F\Delta V$$

Anahtar Deney

Kemiozmotik Teori

Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemiosmotic Type of Mechanism

Peter Mitchell
University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland
Nature, 1961, Volume 191, pages 144-148

Bağlam

Oksidatif fosforilasyonun, elektronların bir dizi taşıyıcıdan geçirilerek moleküler oksijene aşamalı aktarımını kapsadığı 1950'lerde açıkça gösterilmişti. Ancak, bu elektron aktarım reaksiyonlarından çıkan enerjinin ATP'ye nasıl çevrildiği gizemini korumaktaydı. Doğal kanı, glikoliz sürecinde gerçekleştiği bilinen tarzda, yüksek-enerjili fosfat gruplarının diğer bir ara üründen direkt aktarımıyla ADP'nin ATP'ye çevrildiği şeklindeydi. Böylece, elektron taşınma reaksiyonlarının sonucunda yüksek-enerjili ara ürünlerin oluştuğuna ve daha sonra bu ara ürünlerin fosfat grubu transferiyle ATP sentezini sağladıkları kabul edilmişti.

Varlığına inanılan bu yüksek-enerjili ara ürünlerin araştırılması 1950'lerde ve 1960'larda araştırmaların başlıca amacı haline geldi. Ancak, bir çok sahte kanıta karşın, herhangi bir ara ürün bulunmadı. Ayrıca oksidatif fosforilasyonun bazı özelliklerinin, ATP'nin basit bir fosfat grubu transferiyle sentezlendiği şeklindeki geleneksel hipotezle açıklanabilmesi zordu. Öncelikle, fosforilasyon zarlarla yakından ilişkiliydi ve zar yapısını bozan çeşitli bileşikler tarafından inhibe ediliyordu. Bu görüşler Peter Mitchell'i enerji kenetlenmesi için, ATP sentezinin diğer araştırmacıların bulmaya çalıştıkları esrarengiz yüksek-enerjili bir ara ürün ile değil, bir zarın iki yanında oluşan elektrokimyasal gradientle sağlandığı şeklinde, temelde oldukça farklı bir mekanizma önermeye itti.

Deneyler

Kemiosmotik hipotezin temelde ileri sürdüğü, elektron taşınmasını ATP sentezine kenetleyen "ara ürün"ün zarın iki yanındaki proton elektrokimyasal gradienti olduğu idi. Mitchell, böyle bir gradientin elektron taşınmasıyla oluştuğunu, protonların enerjetik olarak uygun olan yönde zardan geri geçişinin ATP senteziyle kenetlendiğini varsaydı (şekle bakınız).

Kemiosmotik kenetlenme hipotezi, ATP sentezi için bozulmamış zar yapısının gerekliliği yanı sıra, yüksek-enerjili bir kimyasal ara ürün bulunamamış olmasına da açıklık getirdi. Ancak bu, zamanın biyokimya inanışlarıyla ters düşen radikal bir düşünceydi. 1961 tarihli bu makalenin son paragrafında Mitchell devrimci görüşü için felsefi bir yorum eklemişti:

> *Gerçek bilimde neden ve sonuç ardışık olaylardan başka bir şey değildir. Biyokimyacılar, şu anda genel olarak metabolizmanın zardan geçişe neden olduğu fikrini benimsiyorlar. Burada öne sürülen hipotezin altında yatan sav, eğer metabolizma ve taşıma olarak adlandırdığımız süreçler ardışık olayları simgeliyorlarsa, yalnızca metabolizmanın taşımanın nedeni değil, taşımanın da metabolizmanın nedeni olabileceğidir.*

Etki

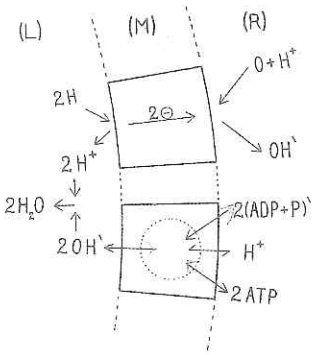
Mitchell'in hipotezi on yıldan daha uzun bir süre kuşkuyla karşılandı ve sert tartışmalara konu oldu. Buna rağmen, diğer araştırmacıların ve Mitchell ile ekibinin elde ettikleri destekleyici kanıtların çokluğu, sonuçta kemiozmotik hipotezin- aslında kemiozmotik teori olarak tanındı- genel kabul görmesini sağladı. Artık sadece bakteri, mitokondri ve kloroplastta oksidatif fosforilasyon ve fotosentez sürecinde ATP üretiminin esası olarak değil, aynı zamanda çeşitli moleküllerin hücre zarlarından enerji-gerektiren taşınımı için de temel olarak kabul edildi.

Mitchell'in çalışması 1978'de Nobel ödülüyle ödüllendirildi. Bu

Peter Mitchell

vesileyle yapmış olduğu konuşma şöyle başladı:

> *Her ne kadar, vektörel metabolizmanın ve biyolojik enerji transferinin kemiozmotik mantığının bir gün genel kabul göreceğini ummuş olsam da, gerçekleşmesini beklemek haddimi aşmak olacaktı. Yeni bir bilimsel görüş karşıtlarının ikna olmasıyla değil, aslında karşıtlarının nihayet ölmesi sonucu zafer kazanır diyen Max Planck değil miydi? Gerçek şu ki, kemiozmotik hipotez olarak başlayan şey, şimdi kemiozmotik teori olarak alkışlanıyor....bu beni hem şaşırttı hem mutlu etti, bunun en önemli nedeni, önceleri benim en yetenekli karşıtlarım olan kişilerin halen bilimsel yaşamlarının en başarılı noktasında olmaları.*



Mitchell'in, sulu R fazı içindeki sulu L fazını çevreleyen bir zar (M) içerisinde, elektron taşıma sistemi (yukarıda) ile ATP-üreten bir sistem (aşağıda) arasındaki kemiozmotik kenetlenmeyi anlatımı.

Bilgi İçin

Bütün yenidoğan memelilerde (ve bazı erişkin memelilerde) "kahverengi yağ" adı verilen özel bir doku bulunur. Kahverengi yağ dokusunun hücrelerindeki mitokondriler, Termogenin adı verilen kenetlenmemiş bir protein içerir. Bu protein, ısı üretiminde proton gradientini kullanır. Kahverengi yağ dokusu yenidoğanlarda ve kışı uykuda geçiren memelilerde sıcaklığın düzenlenmesi için çok önemlidir.

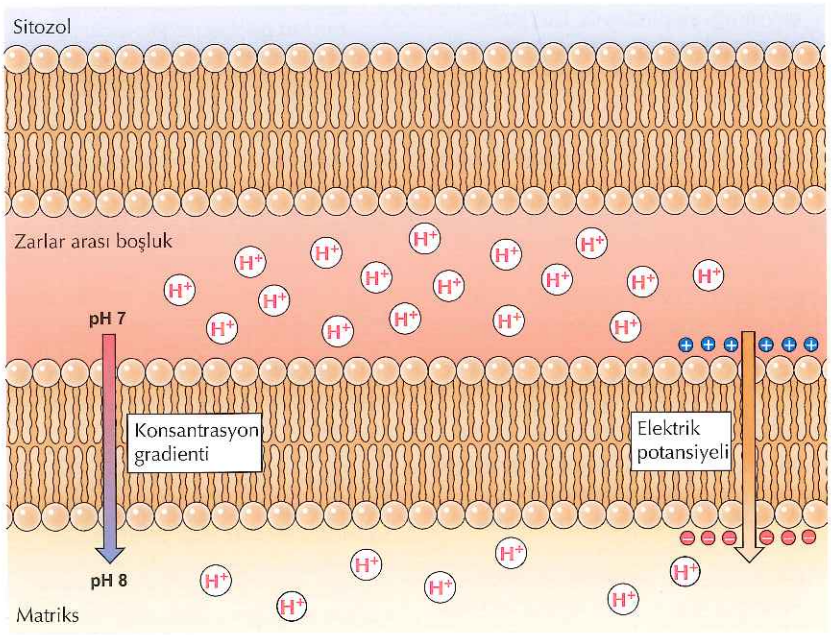
eşitliği ile belirlenir, burada F Faraday sabiti ve ΔV zar potansiyelidir. Zarın iki yanındaki proton konsantrasyonlarının farklılığından kaynaklanan ek serbest enerji:

$$\Delta G = RT \ln \frac{[H^+]_i}{[H^+]_o}$$

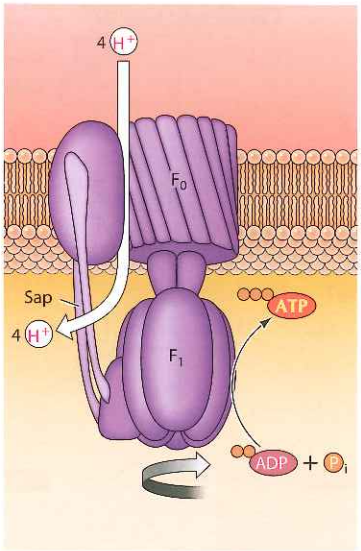
eşitliği ile belirtilir, burada $[H^+]_i$ ve $[H^+]_o$ sırasıyla mitokondrinin içindeki ve dışındaki proton konsantrasyonlarını gösterir.

Metabolik olarak aktif hücrelerde protonlar, zarın iki tarafındaki proton gradienti bir pH birimine denk ise ya da mitokondri içerisinde on kat daha düşük konsantrasyonda proton varsa, matriksden dışarıya pompalanır (**Şekil 3.8**). Bu yüzden mitokodri matriksinin pH'sı sitozolün nötral pH'sına (yaklaşık olarak 7) kıyasla daha yüksektir, 8 civarındadır. Bu gradient, mitokondri içi negatif olmak üzere zarın iki tarafında 0.14 V'luk bir elektrik potansiyeli oluşturur. Hem pH gradienti hem elektrik potansiyeli, protonların sitozolden matrikse geri dönmesini sağlarlar ve bir araya gelerek mitokondri zarının iki yanında ΔG'si her proton için yaklaşık -5 kcal / mol olan bir **elektrokimyasal gradient** oluştururlar.

Protonlar mitokondri dış zarındaki açık kanalların içinden geçebilirler, ancak iç zarı proton akışını ATP sentezine kenetleyen kısıtlı bir kanaldan geçebilirler.



Şekil 3.8 Proton gradientinin elektrokimyasal doğası Protonların pozitif yüklü olmaları nedeniyle, iç mitokondri zarının iki tarafında oluşan proton gradientinin hem kimyasal hem de elektriksel bileşkeleri vardır. Kimyasal bileşke proton konsantrasyonu veya pH gradientidir. Bu iç mitokondri zarının sitozolik yüzündeki on kat daha yüksek proton konsantrasyonundan (bir pH birimlik fark) kaynaklanır. Ayrıca zarın iki tarafında, sitozolik yüzdeki net pozitif yük artışından kaynaklanan, bir elektrik potansiyeli vardır.



Şekil 3.9 ATP sentaz'ın yapısı Mitokondri ATP sentazı (kompleks V), ince bir sapla birbirine bağlanmış iki adet çok alt birimli bileşen, F_0 ve F_1, içerir. F_0, içerisinden protonların zarı geçebileceği bir kanal oluşturacak şekilde lipid çift tabakasını kat eder. F_1, elektrokimyasal gradienti düşürecek yöndeki proton hareketinden serbest enerjiyi, ATP sentezini katalizleyerek, tutar.

Bu, elektrokimyasal gradientteki enerjinin tutularak oksidatif fosforilasyona dahil olan beşinci kompleksin, kompleks V ya da **ATP sentaz,** faaliyeti sonucu ATP'ye dönüştürülmesine olanak sağlar (Bkz. Şekil 3.6). ATP sentaz, yapıları farklı ve ince bir sapla birleşen iki ayrı bileşenden, F_0 ve F_1,oluşur (**Şekil 3.9**). F_0 bölümü zarı kat eder ve protonların zarlar arası boşluktan mitokondriye geri dönmesine olanak veren bir kanal oluşturur. Protonların mitokondriye enerjetik olarak tercih edilen geri dönüşü, ADP ile fosfat iyonlarından (*Pi*) ATP sentezini katalizleyen F_1 alt birimi ile ATP sentezine kenetlenir. Detaylı yapısal çalışmalar, F_0 ile F_1 alt birimleri arasında mekanik bir kenetlenmeyi gerektiren ATP sentazın çalışma prensibini tanımlanmasını sağlamıştır. Özellikle, protonların F_0 içinden akışı F_1'in bir bölümünün dönmesini sağlar, bu da ATP sentezleyen bir döner motor gibi etki eder.

F_1 tarafından bir molekül ATP sentezlenebilmesi için dört protonun, zarı F_0'dan karşı tarafa geçmesi gerekir. Bu her biri bir ATP molekülü sentezini yönlendirmek üzere proton gradientine yeterli serbest enerji sağlayan kompleks I, III ve IV'deki proton aktarımı ile tutardır. Böylece, bir molekül NADH'ın oksitlenmesi üç molekül ATP sentezini sağlarken, elektron taşıma zincirine kompleks II'den giren $FADH_2$'nin oksidasyonu sadece iki ATP sağlar.

Bilgi İçin

Elektrokimyasal döner motor için bir başka örnek bakteri kamçısıdır.

Video 3.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v3.1

ATP Sentaz Aktivitesi ATP sentaz her saniyede yaklaşık 150 kez dönen bir dönüş mekanizması kullanarak ADP ve fosfatdan ATP üretir.

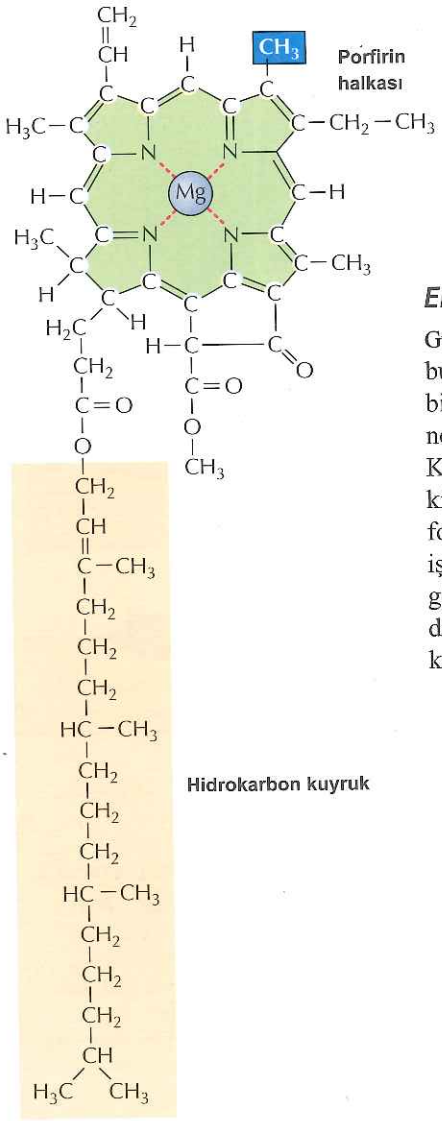
Fotosentez

Karbohidratların ve lipidlerin oksidasyonu ile enerji üretimi, önceden oluşmuş organik moleküllerin yıkılımına bağlıdır. Bu bileşiklerin sentezi için gerekli enerji sonuçta, bitkiler ve fotosentetik bakteriler tarafından elde edilen ve karbohidratların sentezi için itici güç olarak kullanılmakta olan, güneş ışığından elde edilir. Güneş ışığının enerjisini kullanılabilir bir kimyasal enerji formuna dönüştüren fotosentez, gerçekte biyolojik sistemlerin tüm metabolik enerjisinin kaynağıdır.

Fotosentezin genel denklemi aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O \xrightarrow{\text{Işık}} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$$

Ancak, bu süreç çok daha kompleks olup iki ayrı evreden oluşmaktadır. **Işık reaksiyonları** adı verilen birinci evrede, güneş ışığından absorblanan (soğurulan) enerji, H_2O'nun O_2'e yükseltgenmesi ile kenetlenmiş olarak, ATP ve NADPH'ın (NADH'a benzer bir koenzim) sentezini ilerletir. Işık reaksiyonları ile üretilen ATP ve NADPH, güneş ışığı gerektirmediği için **karanlık reaksiyonlar** adı verilen ikinci evrede, CO_2 ve H_2O'dan karbohidratların sentezlenmesi için itici güç yaratır. Ökaryotik hücrelerde, hem ışık hem de karanlık reaksiyonlar kloroplastlarda oluşur.



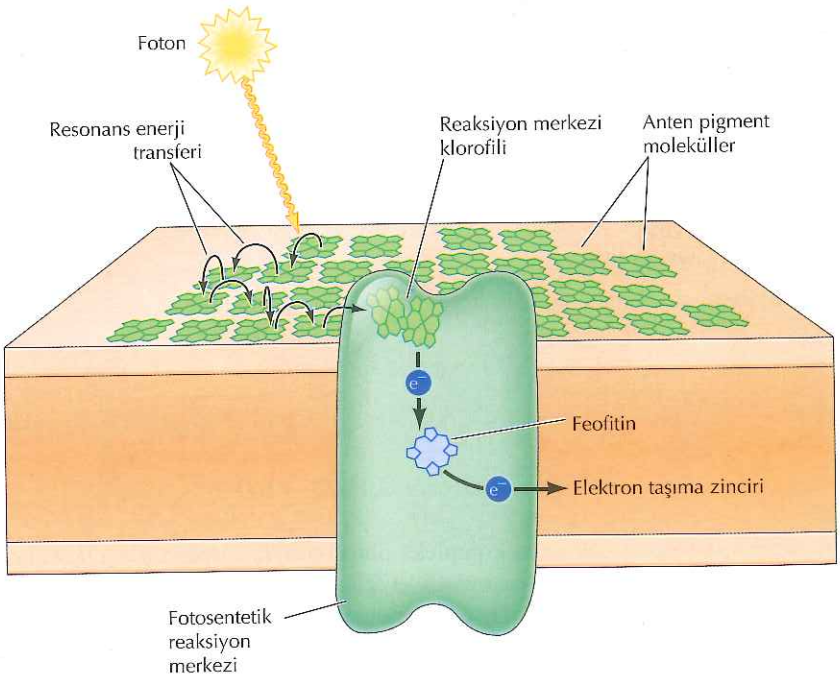
CH_3 klorofil a'da
CHO klorofil b'de

Şekil 3.10 Klorofil a'nın yapısı Klorofiller hidrokarbon kuyruklar ile bağlantılı porfirin halka yapılarından oluşmuştur. Klorofil *a* (burada gösterilmiştir), profirin halkasına bağlı tek işlevsel grup ile klorofil *b*'den farklılık gösterir.

Elektron taşınması

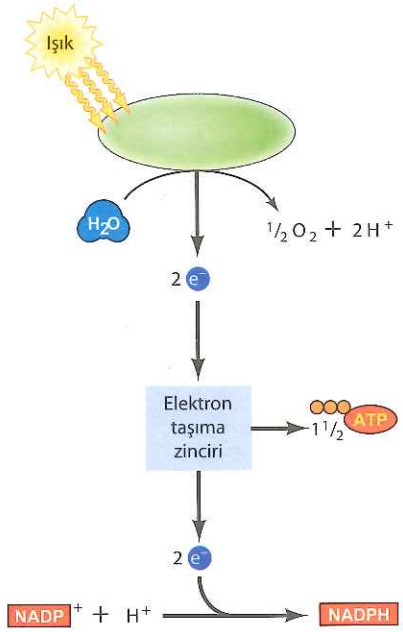
Güneş ışığı fotosentetik pigmentler (boyalar) tarafından, yüksek bitkilerde en bol bulunanı **klorofildir**, absorbe edilir (Şekil 3.10). Güneş ışığının absorbsiyonu bir elektronun, normal moleküler orbitalinden bir üst düzeye atlamasına neden olur ve bu şekilde güneş ışığının enerjisi kimyasal enerjiye dönüşür. Kloroplast zarında fotosentetik pigmentler **fotomerkezler** olarak yapılanırlar ki, bunların herbiri yüzlerce pigment molekülünü içerir (Şekil 3.11). Herbir fotomerkezdeki çok sayıda pigment molekülü ışığı soğuran birer anten olarak işlev yaparak, uyarılmış elektronlarının enerjilerini reaksiyon merkezi olarak görev yapan klorofile taşır. Bu süreçte elde edilen yüksek enerjili elektronların daha sonra bir dizi zar taşıyıcılarından geçmeleri, ATP ve NADPH sentezi ile kenetlenmiştir (Şekil 3.12).

Bitkilerde fotosentezin ışık reaksiyonlarında yer alan proteinler,



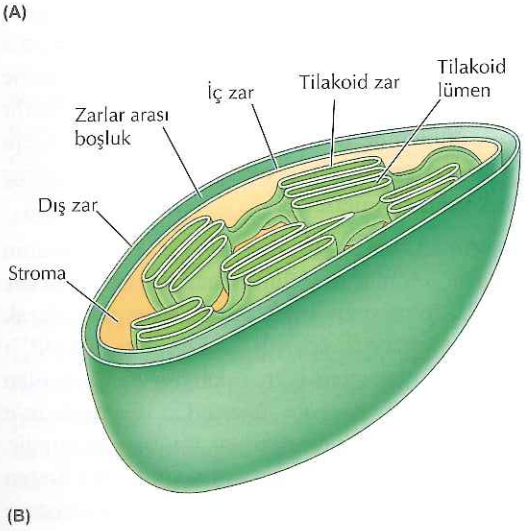
Şekil 3.11 Fotomerkezin organizasyonu Her fotomerkez, fotonları soğuran ve enerjisini bir reaksiyon merkez klorofiline aktaran yüzlerce anten pigment içerir. Daha sonra, reaksiyon merkez klorofili, uyarılmış elektronu elektron taşıma zincirindeki bir alıcıya (feofitin) aktarır.

Animasyon 3.3
sites.sinauer.com/cooper7e/a3.3
Işık Reaksiyonları Fotosentezin ışık reaksiyonları sırasında, güneş ışığından absorblanan (soğurulan) enerji, H_2O'nun O_2'e yükseltgenmesi ile kenetlenmiş olarak, ATP ve NADPH'ın sentezini ilerletir.



Şekil 3.12 Fotosentezin ışık reaksiyonları Güneş ışığının enerjisi H_2O'yu O_2'e parçalamak için kullanılır. Bu reaksiyondan açığa çıkan yüksek-enerjili elektronlar daha sonra bir dizi taşıyıcıdan geçerek $NADP^+$'yi NADPH'a dönüştürmekte kullanılır. Elektron taşıma reaksiyonlarından sağlanan enerji aynı zamanda, ATP'nin sentezini de ilerletir.

kloroplastların özelleşmiş iç zarında (tilakoid zar) dört adet çoklu protein kompleksi olarak düzenlenmişlerdir (Şekil 3.13). Bu komplekslerden ikisi **(fotosistem I** ve **II)** ışığı soğurarak enerjiyi reaksiyon merkezi olan klorofillere taşırlar. Işığın soğurulması ile oluşan yüksek-enerjili elektronlar daha sonra, her iki fotosistem ile üçüncü bir protein kompleksi olan **sitokrom *bf* kompleksindeki** bir dizi taşıyıcıdan geçirilirler. Bu elektron aktarımları,



Şekil 3.13 Kloroplastlarda elektron taşınması ve ATP sentezi (A) Kloroplastlar, zarfın iç ve dış zarlarına ek olarak, tilakoid zar adı verilen üçüncü bir iç zara sahiptirler. Bu zarlar kloroplastı üç farklı bölmeye ayırır (zarlar arası boşluk, stroma ve tilakoid lümen). (B) Elektron taşınımında ve ATP ile NADPH'ın sentezinde, tilakoid zardaki dört protein kompleksi görev yapar. Fotonlar, fotosistem I ve II (PS I ve PS II)'ye bağlı bulunan pigment molekül kompleksleri tarafından soğurulur. Fotosistem II' de foton soğurulmasından çıkan enerji, tilakoid lümen içinde bir su molekülünün ayrıştırılmasında kullanılır. Elektronlar daha sonra plastokinon (PQ) tarafından sitokrom *bf* kompleksine taşınır ve burada elektronlar daha düşük enerji düzeyine indirilirken, protonlar tilakoid lümene pompalanır. Daha sonra elektronlar plastosiyanin (PC) aracılığıyla fotosistem I'e taşınır. Fotosistem I'de ışın soğurulmasıyla elde edilen enerji yeniden yüksek enerjili elektronları oluşturur. Bu elektronlar ferrodoksine (Fd) iletilerek, stromada $NADP^+$'nin NADPH'a indirgenmesi için kullanılır. ATP sentaz, proton gradientinde tutulan enerjiyi ADP'yi ATP'ye dönüştürmek için kullanır.

Bilgi İçin

Fotosistem II' ye bağlanarak elektron taşınmasını önleyen çeşitli bileşikler, yabani otların kontrolünde herbisit olarak kullanılmaktadır.

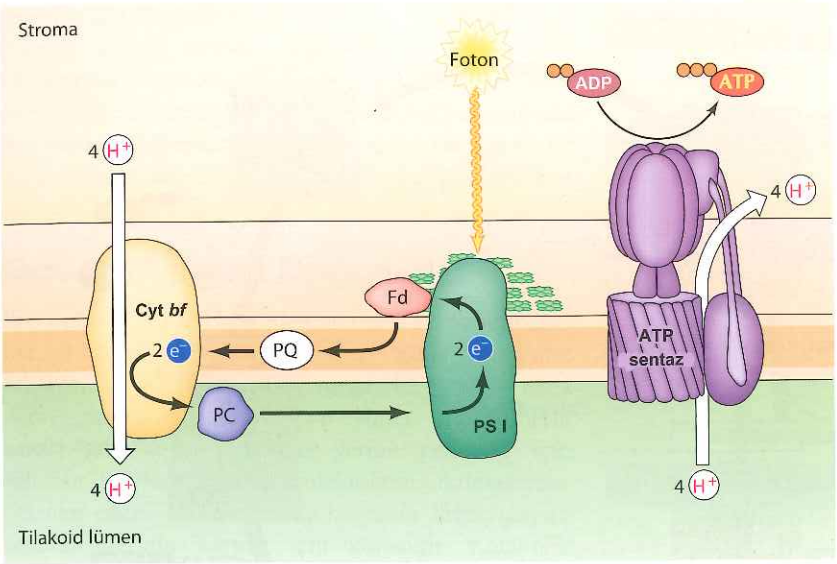
mitokondride olduğu gibi, tilakoid lümenine protonların aktarımı ile eşlenmiştir. Bu zarın bir yüzü ile diğer yüzü arasında bir proton gradient oluşturur. Bu proton gradientinde depolanan enerji daha sonra, ATP sentaz adını alan ve (mitokondriyal enzim gibi) zarın diğer yüzüne proton akışını ATP sentezi ile kenetleyen dördüncü bir protein kompleksi tarafından toplanır.

Kloroplastlar ve mitokondrilerdeki elektron taşınımı arasındaki önemli bir farklılık, fotosentez sırasında güneş ığından elde edilen enerjinin yalnızca ATP'nin dönüştürülmesinde değil, aynı zamanda daha sonra CO_2'nin karbohidratlara dönüşümünde gerekli olan NADPH'nın da üretilmesinde de kullanılmasıdır. Bu da fotosentezin ışık reaksiyonlarında iki değişik sistemin kullanılması ile mümkün olmaktadır: biri ATP üretimi, diğeri de NADPH'ı üretimi. Elektronlar iki fotosistem arasında ardışık olarak taşınmakta ve fotosistem I NADPH oluşturmakla görevli iken fotosistem II de ATP sentezini ilerleten proton gradientini üretmektedir.

Elektron akış yolağı, fotonların soğurulması ile elde edilen enerjinin su moleküllerinin moleküler oksijene ve protonlara ayrışmasında kullanıldığı, H_2O'dan serbestleşen protonların zarın iki yüzü arasında bir proton gradienti oluşturduğu, fotosistem II'de başlar (Bkz. Şekil 3.13). Bu süreçte elde edilen yüksek enerjili elektronlar bir dizi taşıyıcı üzerinden, mitokondrideki koenzim Q (übikinon)'ya benzeyen yağda çözünen bir taşıyıcı olan plastokinon'a iletilir. Plastokinon, elektronları fotosistem II'den sitokrom *bf* kompleksine taşır. Burada elektronlar bir periferal zar proteini olan plastosiyanin'e iletilir ve dört adet ilave proton tilakoid lümenine pompalanır. Böylece, fotosistem II'deki elektron taşınması bir proton gradientinin oluşumu ile kenetlenmiş olur, bu da ATP'nin kemiozmotik sentezini ilerletir.

Elektronlar sitokrom *bf* kompleksinden fotosistem I'e plastosiyanin tarafından taşınırlar. Burada, ilave fotonların soğurulması ile yine yüksek enerjili elektronlar üretilir. Ancak, fotosistem I bir proton pompası olarak işlev görmemektedir, bunun yerine, yüksek enerjili elektronları $NADP^+$'ı NADPH'a indirgemek için kullanır. Fotosistem I'in reaksiyon merkezi olan klorofilde uyarılmış elektronlar bir dizi taşıyıcı üzerinden ferredoksin'e iletilir. Ferredoksin, tilakoid zarın dışında yerleşen küçük bir proteindir. Ferredoksin elektronları ferredoksinden $NADP^+$'a taşıyan ve NADPH üreten **NADP redüktaz** enzimi ile kompleks yapar. Böylece, elektronların fotosistem II ve I'den geçmeleri ile, Calvin döngüsünün enzimleri tarafından CO_2'nin karbohidratlara dönüşümünde kullanılan ATP ve NADPH'ın, her ikisi de üretilmiş olur (aşağıda irdelenecektir).

İkinci bir elektron taşıyıcı sistemi **döngüsel (siklik) elektron akışı** adını alır. Döngüsel elektron akışında, fotosistem I'de yakalanan ışık enerjisi NADPH sentezi için değil, diğer metabolik aktiviteler için ek ATP sağlamak üzere, ATP sentezi için kullanılır (**Şekil 3.14**). Fotosistem I'den yüksek enerji elektronlar $NADP^+$'ya taşınmak yerine sitokrom *bf* kompleksine taşınırlar. Sitokrom *bf* kompleksinde elektron taşınması, fotosistem II'de olduğu gibi, tilakoid zarın iki yüzü arasında proton gradienti oluşumu ile kenetlenmiştir. Daha sonra plastosiyanin bu elektronları fotosistem I'e, daha düşük bir enerji düzeyinde bırakarak bir elektron taşıma döngüsünü tamamlar. Böylece, hücrenin metabolik gereksinimlerine bağlı olarak, fotosistem I'den elektron taşınması ya ATP ya da NADPH üretebilir.



Şekil 3.14 Döngüsel elektron akış yolağı Fotosistem I (PS I)' de soğurulan ışık enerjisi NADPH yerine ATP sentezinde kullanılır. Foton soğurulmasıyla elde edilen yüksek-enerjili elektronlar, ferredoksin (Fd) ve plastokinon (PQ) üzerinden $NADP^{+}$'ye değil, sitokrom *bf* kompleksine aktarılır. Sitokrom *bf* kompleksinde elektronlar daha düşük enerjili duruma geçirilirken, protonlar tilakoid lümene pompalanır. Elektronlar daha sonra plastosiyanin (PC) tarafından Fotosistem I'e geri döndürülür. Sonra ATP sentaz ATP sentezini, tilakoit lümenden stromaya proton akışına eşleştirir.

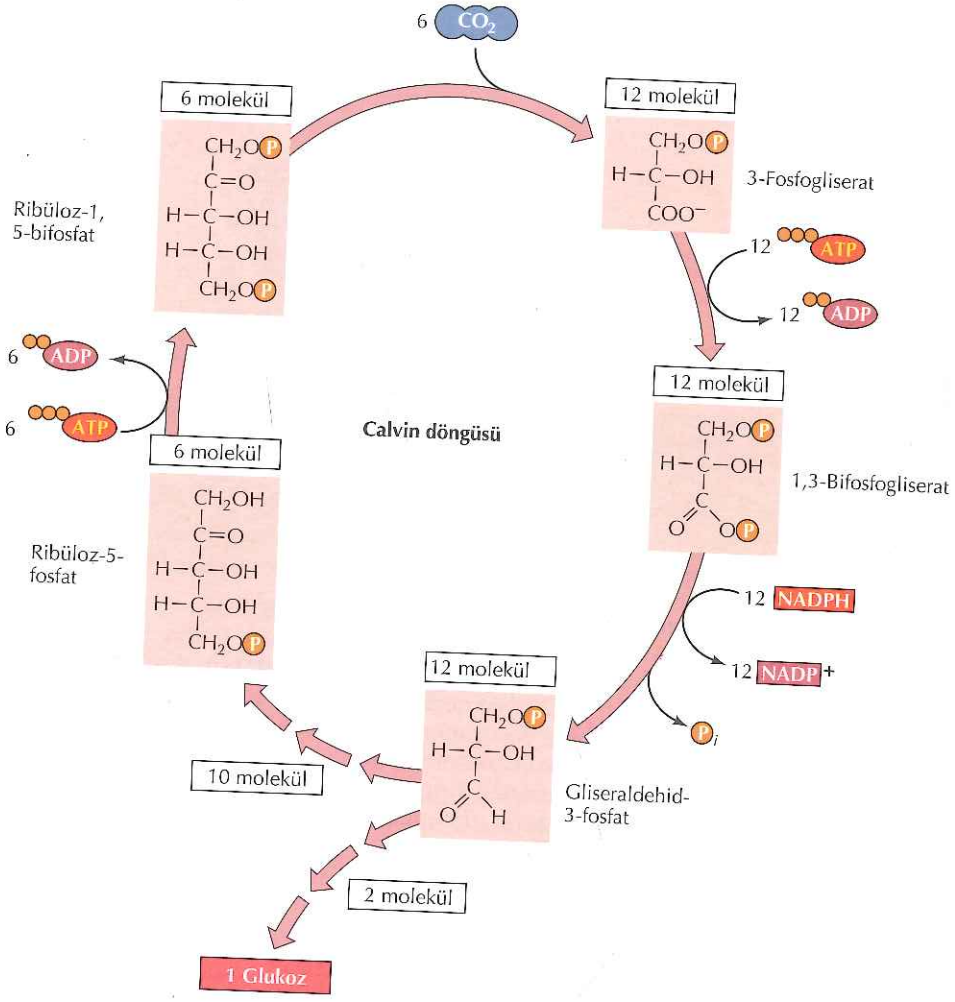
ATP sentezi

Kloroplast ATP sentazı mitokondriyal enzime benzemektedir. Ancak, kloroplast tilakoid zarının proton gradientinde depolanan enerji, iç mitokondri zarındakine kıyasla hemen tümüyle kimyasal karakterdedir. Çünkü, tilakoid zar protonlara geçirgen olmamasına karşın, özellikle Mg^{2+} ve Cl^{-} gibi diğer iyonlara geçirgen olması nedeniyle mitokondri iç zarından farklıdır. Bu iyonların serbestçe geçmesi, proton gradientinin voltaj bileşenini nötralize eder, fotosentezde üretilen enerji çoğunlukla zarın iki yüzünde proton konsantrasyon (pH) farkı oluşturularak korunur. Ancak, tilakoid lümen kapalı bir bölme olduğu için, proton konsantrasyon farkı oldukça büyük olabilir ve bu tilakoid lümen ile stroma arasında üç pH biriminden daha büyük pH farklılığı bulunuşuyla uyumludur. pH farkının büyüklüğü nedeniyle tilakoid zar boyunca depolanan toplam serbest enerji, iç mitokondri zarında depolanana yakındır.

Taşınan her bir çift elektron için tilakoid zardan, fotosistem II'de iki proton ve sitokrom *bf* kompleksinden dört proton pompalanır. Bir molekül ATP sentezini yönlendirmek için dört proton gerektiğinden, fotosistem I ve II'den döngüsel olmayan elektron akışıyla geçen her bir çift elektron 1,5 ATP molekülü sağlar. Döngüsel elektron akışının getirisi daha azdır, her elektron çifti 1 ATP molekülü verir.

Glukoz sentezi

Kloroplast stromasında gerçekleşen karanlık reaksiyonlarda, ışık reaksiyonlarında üretilen ATP ve NADPH, CO_2 ve H_2O'dan karbohidratların



Şekil 3.15 Calvin döngüsü Burada bir glukoz molekülünün altı adet CO_2 molekülünden sentezi gösterilmektedir. Her bir CO_2 molekülünün ribüloz-1,5- bisfosfata eklenmesi ile, iki molekül 3-fosfogliserat oluşur. Bu altı CO_2 molekülü böylece, 12 molekül 3-fosfogliserat oluşumuna neden olur. Bunlar da, 12 molekül ATP ve 12 molekül NADPH harcanarak, 12 molekül gliseraldahid-3-fosfata dönüşür. Daha sonra, iki molekül gliseraldehid-3-fosfat glukoz sentezi için kullanılır. Diğer on molekül Calvin döngüsünde devam etmesi ile, altı molekül ribüloz-5-fosfat oluşur. Döngü altı ilave ATP molekülünün ribüloz-1,5-bisfosfat oluşumu için kullanılması ile son bulur.

Animasyon 3.4
sites.sinauer.com/cooper7e/a3.4
Calvin Döngüsü Fotosentezin Calvin döngüsünde, altı adet karbondioksit molekülü kullanılarak bir glukoz molekülü üretilir.

sentezi için itici gücü oluşturur. Bulan kişi olan Melvin Calvin'in adıyla **Calvin döngüsü** adı verilen reaksiyon döngüsüne, CO_2 birer birer eklenir ve karbohidratlar oluşur (Şekil 3.15). Calvin döngüsünde, sentezlenen her glukoz molekülü için 18 molekül ATP ve 12 NADPH tüketilir. Her bir $NADP^+$ molekülünü NADPH'a dönüştürmek için iki elektrona gereksinim vardır. Böylece, bir molekül glukozun sentezi için yeterli miktarda NADPH üretimi için 24 adet elektron elektron taşıma zincirinden geçmelidir. Bu elektronlar, 12 molekül suyun altı molekül O_2'e dönüşümü ile elde edilir ki bu da, her bir glukoz molekülü için altı O_2 molekülü oluşumu ile uyumludur. Aynı 24 elektronun elektron taşıma zincirinden geçmesi, Calvin döngüsü için

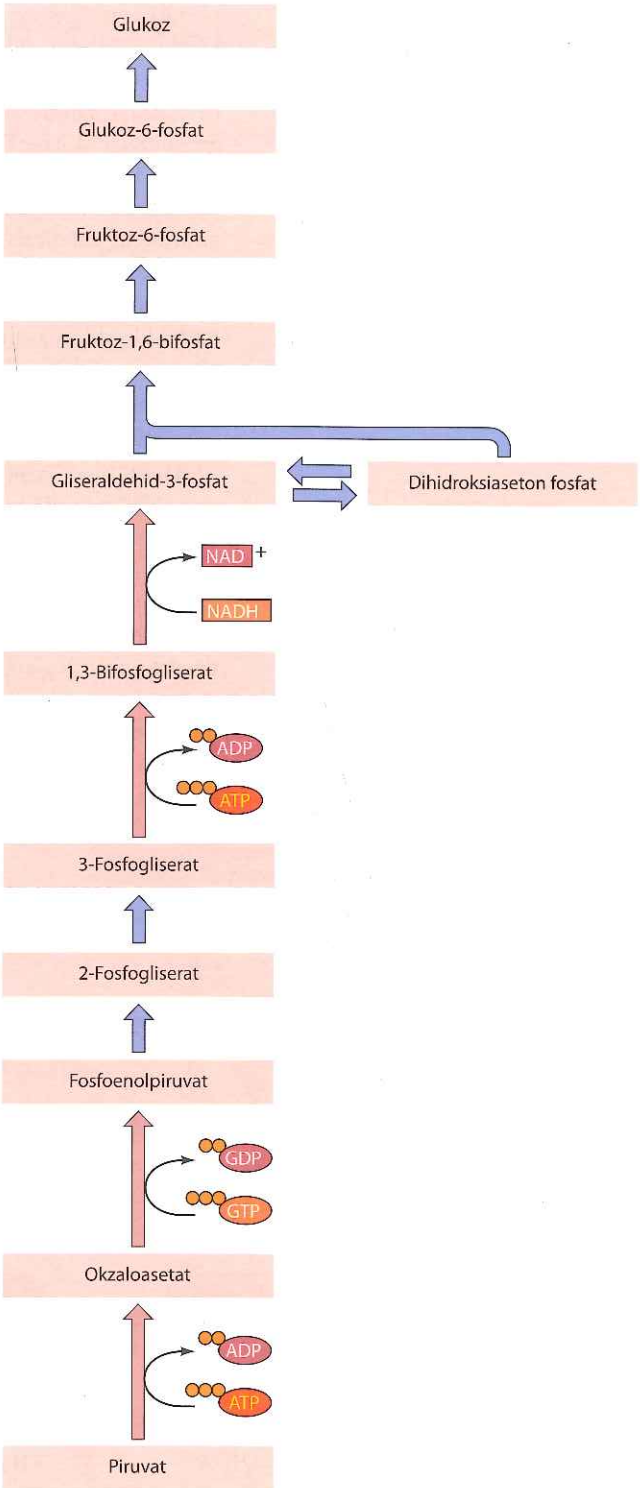
gerekli olan 18 ATP'yi üretmek için yeterlidir. Bazı koşullar altında elektron taşınması ile elde edilen ATP verimi yeterli olmadığında, Calvin döngüsü için gerekli ATP moleküllerinden bazıları, güneş ışığının enerjisini NADPH sentezi yapmaksızın, yalnızca ATP sentezi yapan alternatif elektron taşıma zincirlerinde üretilebilir (bkz. Şekil 3.14).

Hücre Bileşenlerinin Biyosentezi

Bir önceki bölümde, hücrenin ATP formundaki enerjiyi elde ettiği ve depoladığı temel metabolik reaksiyonlar özetlendi. Bu metabolik enerji daha sonra, makromoleküllerin ve diğer moleküllerin sentezi gibi çeşitli işlevleri yerine getirmek için kullanılır. Böylece, organik moleküllerin yıkılmasından sağlanan enerji (katabolizma) hücrenin diğer gerekli komponentlerinin sentezi için kullanılır. Katabolik yolların çoğunluğu, hem enerji (ATP), hem de indirgeyici kuvvet (NADH) üretimi ile kenetlenmiş olan organik moleküllerin yükseltgenmesini içerir. Buna karşın, biyosentetik (anabolik) yolaklar genellikle hem ATP hem de indirgeyici kuvvet (genelde NADPH formunda) kullanılarak yeni organik bileşiklerinin sentezi ile ilişkilidir. Temel bir biyosentetik yolak, fotosentezin karanlık reaksiyonlarında CO_2 ve H_2O'dan karbohidratların sentezi, bir önceki konuda tartışılmıştır. Temel hücre bileşenlerinin (karbohidratlar, lipidler, proteinler ve nükleik asitler) biyosentezi ile ilgili diğer yolaklar da izleyen konuda ele alınmıştır.

Karbohidratlar

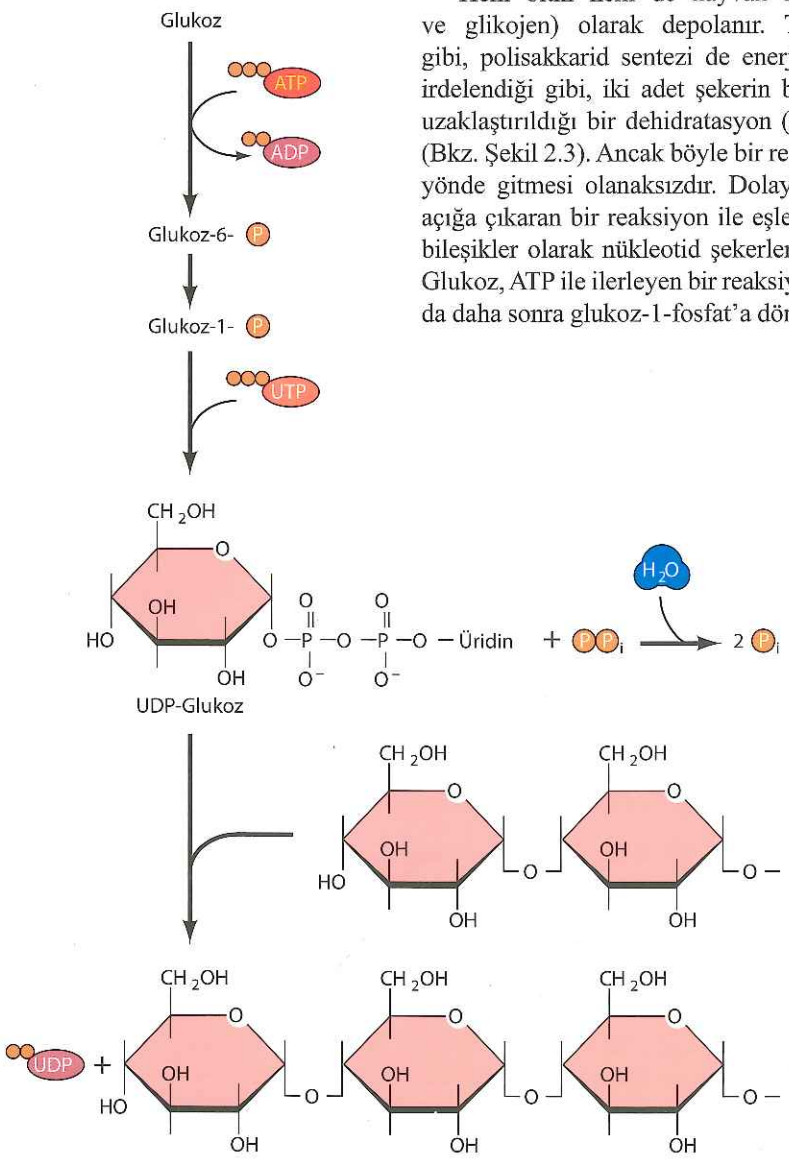
Besin maddelerinden doğrudan elde edilmesine veya fotosentez ile üretilmesine ek olarak, glukoz diğer organik moleküllerden de sentezlenebilir. Hayvan hücrelerinde, glukoz sentezi (**glukoneogenez**), genelde laktat (anaerobik glikolizde oluşur), amino asitler (proteinlerin yıkılımından elde edilir) veya gliserol (lipidlerin yıklımı ile üretilir) ile başlar. Bitkiler (hayvanlar değil) glukozu yağ asitlerinden de sentezleyebilirler—bu işlem özellikle tohumların filizlenmesi sırasında önemlidir. Zira yağ olarak depolanan enerjinin, bitkinin büyümesini destekleyebilmesi için, mutlaka karbohidratlara dönüştürülmesi gerekir. Hem hayvan hem de bitki hücrelerinde, basit şekerler polimerleştirilerek polisakkarid olarak depolanırlar.



Şekil 3.16 Glukoneogenesis Glukozun iki molekül piruvattan üretimi, dört molekül ATP, iki molekül GTP ve iki molekül NADPH gerektirir. Glukoneogenezin enerji gerektiren adımları, pembe oklar ile gösterilmiştir.

Glukoneogenez (**Şekil 3.16**) piruvatın glukoza dönüşümünü içerir—esansiyel olarak, glikolizin tersidir. Ancak, daha önce tartışıldığı gibi, glukozun piruvata glikolitik yoldan dönüşümü enerji serbestleştiren bir olaydır ve ATP ile NADH'dan ikişer molekül üretilir. Glikolizin bazı reaksiyonları kolaylıkla geri dönüşümlü ise de, diğerleri büyük serbest enerji düşüşü ile ilişkili olmaları nedeni ile, sadece glukozun yıkılması yönünde ilerlerler. Glikolizin bu enerji yönünden elverişli reaksiyonları, glukoneogenez sırasında (değişik enzimler tarafından katalizlenen) ve glukoz sentezi yönünde ilerlemeyi sağlamak için ATP ve NADH tüketimine kenetlenmiş olan başka reaksiyonlar tarafından atlanırlar. Glukozun iki molekül piruvattan üretimi toplam olarak dört molekül ATP, iki molekül GTP ve iki molekül NADPH gerektirir. Bu süreç, glikolizin (iki molekül ATP ve iki molekül NADH gerektirecek olan) basitçe geriye döndürülmesinden çok daha masraflı olup, yolağı biyosentez yönüne çevirmenin ilave enerjiye ihtiyaç duyduğunu gösterir.

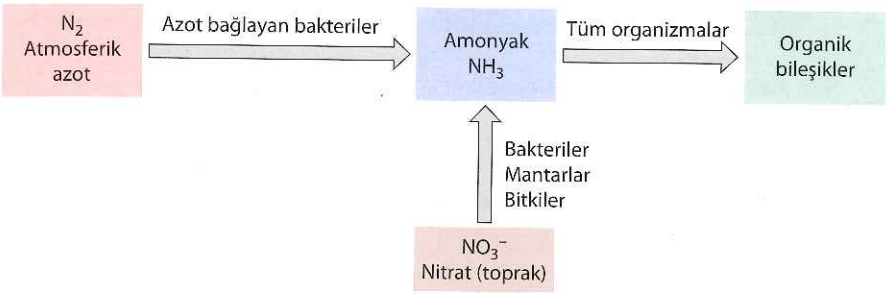
Hem bitki hem de hayvan hücrelerinde, glukoz, polisakkarid (nişasta ve glikojen) olarak depolanır. Tüm diğer makromoleküller için olduğu gibi, polisakkarid sentezi de enerji gerektiren bir reaksiyondur. Bölüm 2'de irdelendiği gibi, iki adet şekerin bir glikozidik bağ ile bağlanması, H_2O'nun uzaklaştırıldığı bir dehidratasyon (susuzlaştırma) reaksiyonu olarak yazılabilir (Bkz. Şekil 2.3). Ancak böyle bir reaksiyon enerji yönünden elverişsiz olup, ileri yönde gitmesi olanaksızdır. Dolayısıyla, bir glikozidik bağın oluşumu enerji açığa çıkaran bir reaksiyon ile eşlenmelidir. Bu da polisakkarid sentezinde ara bileşikler olarak nükleotid şekerlerin kullanılması ile gerçekleşir (**Şekil 3.17**). Glukoz, ATP ile ilerleyen bir reaksiyon ile önce glukoz-6-fosfata fosforillenir, bu da daha sonra glukoz-1-fosfat'a dönüşür. Glukoz-1-fosfat, UTP (üridin trifosfat) ile reaksiyona girerek UDP-glukoz ile pirofosfat oluşturur, pirofosfat da ilave serbest enerji açığa çıkarması ile fosfata hidrolize edilir. UDP-glukoz, aktif bir ara bileşik olup enerjetik yönden elverişli bir reaksiyon ile, glukoz kalıntısını büyüyen bir polisakkarid zincirine verir. Böylece, ATP ve UTP formundaki kimyasal enerji basit şekerlerden polisakkaridlerin sentezini sağlar.



Şekil 3.17 Polisakkaridlerin sentezi Glukoz önce, bir molekül ATP ve bir molekül UTP kullanılarak, aktif formu olan UDP-glukoza dönüştürülür. Bundan sonra, glukoz UDP-glukozdan, enerjetik olarak elverişli bir reaksiyon ile, büyüyen bir polisakkarid zincirine aktarılır.

Lipidler

Lipidler önemli enerji depo molekülleridir ve hücre zarlarının temel bileşenlerindendir. Karbohidratların yıkılması ile üretilen Asetil CoA'dan, yağ asiti oksidasyonunun tersine benzeyen bir



Şekil 3.18 Azotun organik bileşiklerin yapısına alınması Amonyak, tüm organizmalar tarafından organik bileşiklerin yapısına alınabilmektedir. Bazı bakteriler atmosferin azotunu amonyağa dönüştürebilmektedir. Bakteri, mantar ve bitkilerin çoğunluğu topraktaki nitratı kullanabilmektedir.

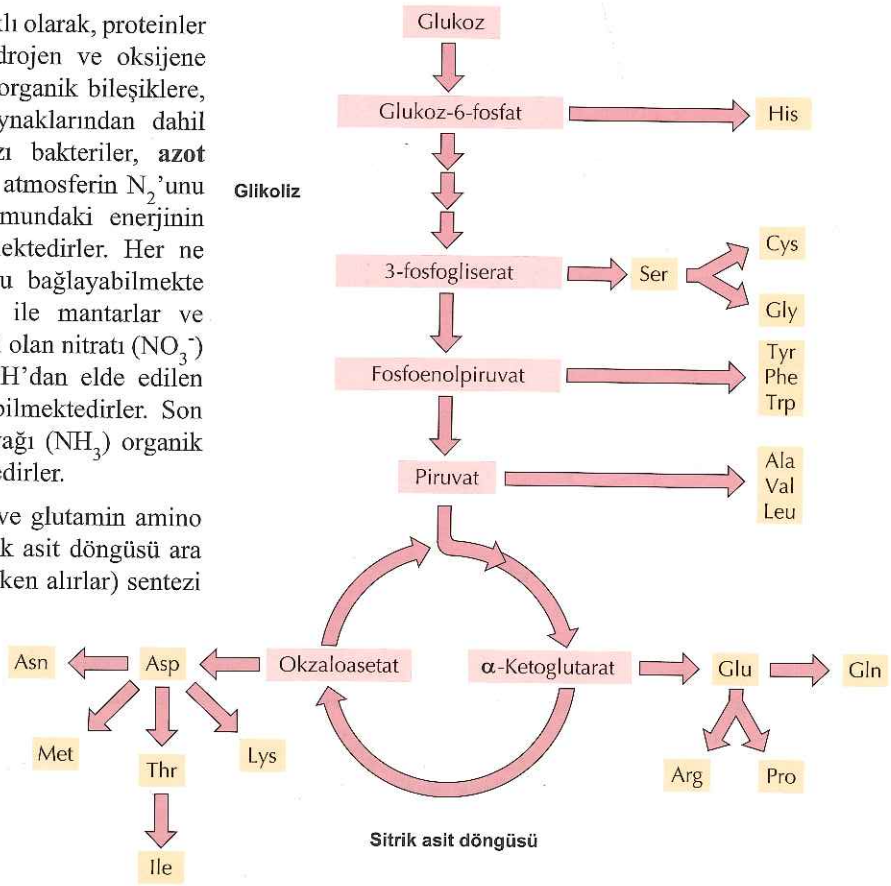
dizi reaksiyon ile sentezlenir. Karbohidrat sentezinde olduğu gibi, yağ asitlerin sentezine yol açan reaksiyonlarda, yıkılmalarında neden olan reaksiyonlardan farklıdır. Bu süreç hem ATP formundaki enerji, hem de NADPH formundaki indirgeyici kuvvetin tüketimi ile kenetlenerek, biyosentetik yönde ilerlerler. Yağ asitleri, asetil CoA'dan elde edilen iki-karbonlu birimlerin, büyüyen bir zincire basamak basamak eklenmesi ile sentezlenir. Bu iki-karbonlu birimlerin her birinin eklenmesi, bir ATP molekülü ve iki molekül NADPH gerektirir.

Yağ asiti biyosentezi, ökaryotlann sitozolinde gerçekleşir ve temel ürünü 16-karbonlu bir yağ asiti olan palmitattır. Hücre zarlarının temel bileşenleri (fosfolipidler, sfingomyelin ve glikolipidler) bu serbest yağ asitlerinden, endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtında sentezlenirler (bkz. Bölüm 11).

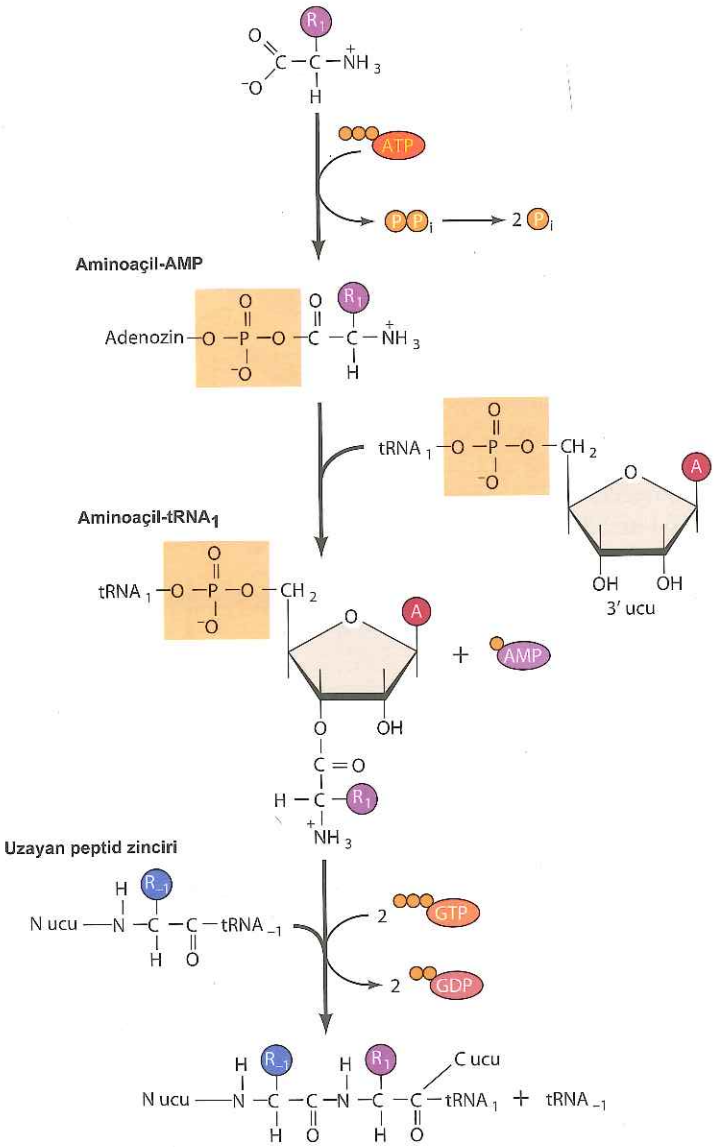
Proteinler

Karbohidratlar ve lipidlerden farklı olarak, proteinler (ve nükleik asitler) karbon, hidrojen ve oksijene ilave olarak azot içerirler. Azot organik bileşiklere, farklı organizmaların farklı kaynaklarından dahil edilmektedir (**Şekil 3.18**). Bazı bakteriler, **azot bağlama** adı verilen bir işlemle atmosferin N_2'unu kullanabilmekte, N_2'u ATP formundaki enerjinin harcanması ile NH_3'a indirgemektedirler. Her ne kadar çok az bakteri türü azotu bağlayabilmekte ise de, bakterilerin çoğunluğu ile mantarlar ve bitkiler toprağın ortak bir bileşeni olan nitratı (NO_3^-) kullanarak, NADH veya NADPH'dan elde edilen elektronlar ile NH_3'a indirgeyebilmektedirler. Son olarak, tüm organizmalar amonyağı (NH_3) organik bileşiklerin yapısına katabilmektedirler.

NH_3 primer olarak glutamat ve glutamin amino asitlerinin (bu amino asitler, sitrik asit döngüsü ara bileşiği olan α-ketoglutarattan köken alırlar) sentezi



Şekil 3.19 Amino asitlerin biyosentezi Amino asitlerin karbon iskeletleri glikoliz ve Krebs döngüsünün ara bileşiklerinden sağlanır.



Şekil 3.20 Peptid bağının oluşması Bir amino asit önce kendi tRNA'sına, ATP'nin AMP'ye hidrolizini gerektiren, iki-basamaklı bir reaksiyon ile bağlanarak aktifleşir. tRNA'lar amino asitleri, ribozomlara bağlanmış olan mRNA kalıpları üzerinde sıralamak için adaptör olarak işlev görürler. Her bir amino asit, daha sonra büyüyen peptidin C ucuna, iki ilave GTP molekülü harcanarak, aktarılır.

Tablo 3.1 İnsanlarda Amino Asitlerin Besinlerle Alınma Gereksinimleri

Esansiyel	Esansiyel Olmayan
Histidin	Alanin
İzolösin	Arjinin[a]
Lösin	Asparajin
Lizin	Aspartat
Metiyonin	Sistein
Fenilalanin	Glutamat
Treonin	Glutamin
Triptofan	Glisin
Valin	Prolin
	Serin
	Tirozin

Esansiyel amino asitler besin kaynaklarından elde edilmelidir. Esansiyel olmayan amino asitler insan hücreleri tarafından sentezlenebilir.
[a]Arjinin, esansiyel olmayan amino asit olarak sınıflandırılmış olmasına rağmen, büyüme çağındaki çocuklar besinlerinden ek arjinin almalıdırlar.

sırasında organik moleküllerin yapılarına alınmaktadır. Daha sonra bu amino asitler, glikoliz ve sitrik asit döngüsü gibi merkezi metabolik yollardan köken alan diğer amino asitlerin sentezi sırasında amino grubu vericisi olarak işlev görürler (**Şekil 3.19**). Böylece amino asit sentezi için ham madde gereksinimi glukozdan sağlanır ve amino asitler, enerji (ATP) ve indirgeyici kuvvet (NADPH) harcanarak sentezlenirler. Birçok bakteri ve bitkiler, tüm 20 amino asiti sentezleyebilirler. Ancak, insanlar ve diğer memeliler gerekli amino asitlerin yalnızca yarısı kadarını sentezlerler, kalan kısmı besin kaynaklarından elde edilir (**Tablo 3.1**).

Amino asitlerin proteinleri oluşturmak üzere polimerleşmeleri de enerji gerektirir. Polisakkaridlerin sentezinde olduğu gibi, peptid bağının oluşumu bir dehidrasyon reaksiyonu olarak ele alınır ve bunun protein sentezi yönünde ilerleyebilmesi için bir başka metabolik enerji kaynağı ile kenetlenmesi gerekir. Polisakkaridlerin biyosentezinde bu kenetlenme, şekerlerin UDP-glukoz gibi aktif ara bileşiklere dönüştürülmesi ile gerçekleşir. Amino asitler de benzer olarak, protein sentezi için kullanılmalarından önce aktive edilirler.

Protein biyosentezi ile polisakkarid biyosentezi arasındaki kritik bir farklılık, amino asitlerin, proteinlere, bir gen tarafından

Anahtar Deney

Antimetabolitler ve Kemoterapi

Antagonists of Nucleic Acid Derivatives VI. Purines

Gertrude B. Elion, Geroge H. Hitchings and Henry Vanderwerff
Wellcome Research Laboratories, Tuckahoe, NY

Journal of Biological Chemistry, Volume 192, 1951, pages 505-518

Bağlam

Gertrude Elion ve George Hitchings 1944'de, 20 yıl süren ve kanser, gut, virüs ve parazit enfeksiyonlarının tedavisinde etkili ilaçların geliştirilmesi ile sonuçlanan bir kollaborasyon oluşturdular. İlaç gelişimine yaklaşım biçimleri, antimetabolit kuramını temel almıştır. Bu kuram, önceleri, bakteriye karşı etkili olan bazı ilaçların, bakteri hücreleri tarafından esansiyel besinlerin (metabolitlerin) kullanımlarını engelleyerek işlev yaptığını öngörmekteydi. Elion ve Hitchings, kanser hücreleri gibi hızlıca bölünen hücrelerin gelişiminin, DNA'nın normal sentezini bozan nükleik asit baz analogları tarafından durdurulabileceğini önerdiler. Bu hipotezi test etmek için pürinlerle ilişkili çok sayıda bileşiği sentezleyerek biyolojik etkilerini incelediler. Bu çalışmalar, 6-merkaptopürin'in bakteride pürin kullanımını büyük ölçüde durdurduğu bulgusuna yol açtı. Bunu da, çocukluk çağı akut lösemisinin tedavisinde bu ilacın etkin olduğunu gösteren çalışmalar izledi.

Deneyler

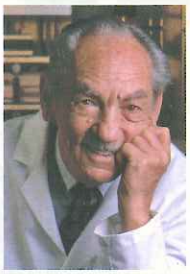
Elion ve Hitchings pürin analoglarının *Lactobacillus casei* bakterisinin büyümesi üzerindeki potansiyel etkinliklerini araştırdılar. 1948 yılında, 2,6-diaminopürin bileşiğinin, normal pürin metabolizmasını etkileyerek *L. casei*'nin büyümesini durdurduğunu buldular. Bu bulgularını, halkasının değişik pozisyonlarında amino, hidroksil, metil, kloro, sülfhidril ve diğer kimyasal grupları taşıyan 100 farklı pürin'in etkilerini deneyerek 1951'de yayımladıkları makalelerinde daha da genişletmiş oldular. Oksijen'in guanin ve hipoksantin'in 6. pozisyonunda kükürt ile yer değiştirdiği iki bileşik olan 6-merkaptopürin ve 6-tiyoguanin'in bakteri büyümesinin kuvvetli inhibitörleri oldukları bulundu (şekle bakınız). Daha sonra bu bileşiklerin çeşitli kemiricilerde kanser büyümesini aktif olarak durdurduklarının bulunması, 6-merkaptopürin'in ilk olarak çocukluk çağı lösemilerinde denenmesine yol açtı. Bu denemenin sonuçları çarpıcı biçimde başarılı idi. 6-Merkaptopürin'in çocukluk çağı lösemilerinin tedavisinde kullanımı, Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration) tarafından 1953'de -bu bileşiğin sentezlenip bakteride pürin antimetaboliti olarak etkinliğinin gösterilmesinden iki yıl sonra- kabul edildi.

Etki

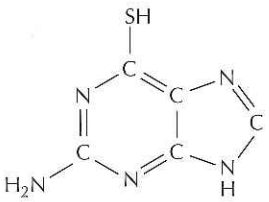
Çocukluk çağı lösemilerinin 6-merkaptopürin ile tedavisindeki başarı, nükleik asit metabolizması inhibitörlerinin kansere karşı etkin ilaçlar olabileceği yönünde inandırıcı kanıtlar sağladı. Bu, bugün halen geçerlidir ve 6-merkaptoetanol, lösemi tedavisinde başarılı olarak kullanılan ilaçlardan biri olmaya devam etmektedir. Buna ek olarak, nükleik asit metabolizmasını etkileyen başka antimetabolitlerin de kanserin tedavisinde etkin oldukları bulunmuştur.

Gertrude Elion ve George Hitching, pürin antimetabolitleri üzerindeki kollaboratif çalışmalarına, Hitching'in 1967'de emekli olmasına kadar devam ettiler. 6-Merkaptopürin'e ek olarak, doku transplantasyonu sonrasında immünosüpresyon sağlayan, romatoid artrit, gut ve parazit enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçlar geliştirdiler. Hitching'in emekliliği sonrasında, Elion araştırmalarını viral enfeksiyonların tedavisine odaklayarak insan viral enfeksiyonlarına karşı etkili olan ilk ilacı-guanin analoğu asiklovir'i-geliştirdi. Bu ilaç herpes simpleks ve diğer herpes virüslerine karşı yüksek derecede aktiftir. Antiviral ilaçlar olarak nükleik asit antimetabolitlerinin geliştirilmesinde sonraki başarı timin analoğu AZT'yi de kapsamakta olup, bu ilaç AIDS'in tedavisinde HIV inhibitörü olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Elion ve Hitchings'in bu alandaki öncül çalışmaları, birçok yeni araştırma alanını ortaya çıkarmış ve geniş yelpazede hastalıkların tedavisinde güçlü bir etki yaratmıştır.

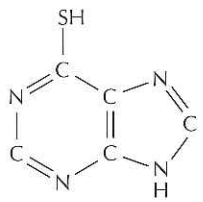
Gertrude B. Elion



George H. Hitchings



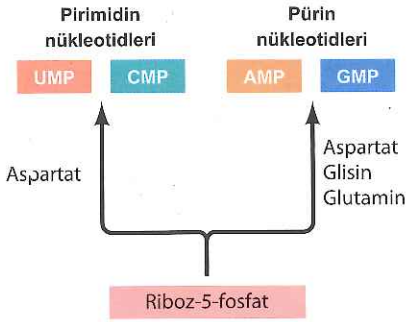
6-Tiyoguanin



6-Merkaptopürin

6-tiyoguanin ve 6-Merkaptopürin yapıları.

belirlenmiş özgün bir sıra ile katılmalarıdır. Gendeki nükleotidlerin dizilimi, translasyon sırasında amino asitlerin dizilimini belirlemekte ve bu süreçte RNA (mRNA) protein sentezi için bir kalıp işlevi görmektedir (bkz. Bölüm 4). Herbir amino asit, önce spesifik bir transfer RNA (tRNA) molekülüne, ATP hidrolizi ile kenetlenen bir reaksiyonla bağlanmaktadır (**Şekil 3.20**). Daha sonra, aminoaçil



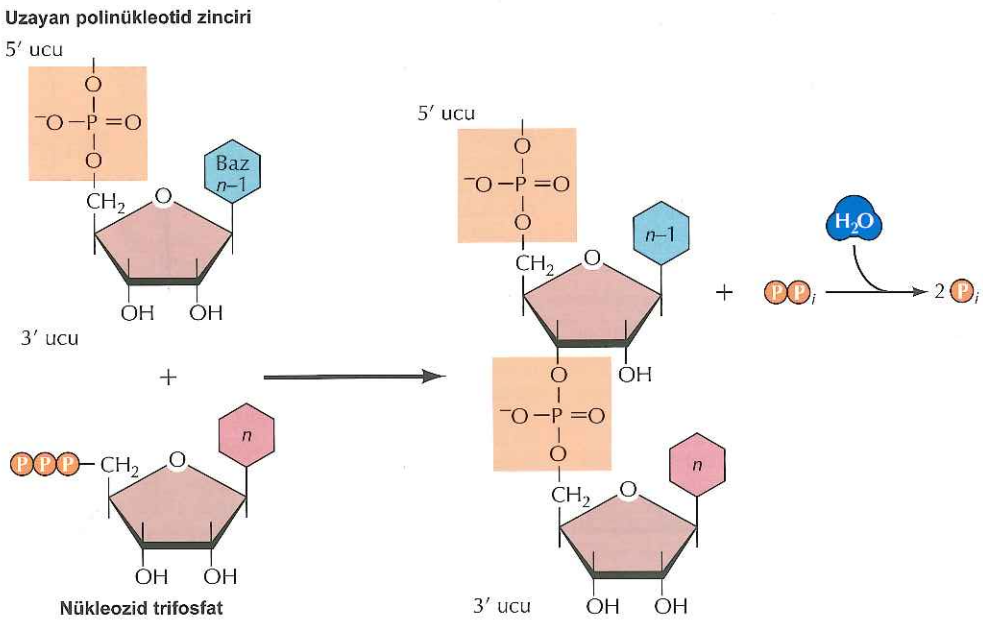
Şekil 3.21 Pürin ve pirimidin nükleotitlerinin biyosentezi Pürin ve pirimidin nükleotitleri 5-karbonlu şekerlerden (riboz-5-fosfat) ve aminoasitlerden sentezlenir.

transfer RNA'lar, ribozomlara bağlanmış olan mRNA kalıbı üzerinde dizilirler ve her bir amino asit, büyüyen peptidin C-ucuna, Bölüm 9'da ayrıntılı olarak ele alınmış olan bir dizi reaksiyon ile eklenir. Bu işlem sırasında, iki ilave GTP molekülü hidroliz olmaktadır. Yani her bir amino asitin proteinin yapısına alınması bir ATP ve iki GTP'nin hidrolizi ile kenetlenmiştir.

Nükleik asitler

Nükleik asitlerin öncül maddeleri olan nükleotidler, nükleik asit bazlarına bağlı, fosforillenmiş beş-karbonlu şekerlerden oluşurlar. Nükleotidler karbohidratlardan ve amino asitlerden sentezlenebilirler. Aynı zamanda, besin kaynaklarından elde edilebilirler ya da nükleik asit yıkılımı sonrasında tekrar kullanılabilirler. Nükleotid biyosentezi için başlangıç noktası fosforillenmiş şeker olan riboz-5-fosfattır ki bu, glukoz-6-fosfattan türer. Sonra ayrılan yollarda, pürin ya da pirimidin ribonükleotidlerinin sentezi gerçekleşir ki bu moleküller, RNA sentezi için acil öncül maddelerdir (Şekil 3.21). Bu ribonükleotidler, DNA'nın monomerik yapı taşları olan deoksiribonükleotidlere dönüştürülürler.

RNA ve DNA nükleozid monofosfatların polimerleridir. Ancak, diğer makromoleküller için olduğu gibi, nükleozid monofosfatların doğrudan polimerleşmeleri enerjetik yönden elverişli değildir. Bu nedenle oligonükleotidlerin sentezinde nükleozid trifosfatlar aktif öncüller olarak kullanılır (Şekil 3.22). Bir nükleozid 5′-trifosfat, büyüyen bir polinükleotid zincirinin 3′ hidroksil grubuna eklenir, pirofosfat grubu serbestleşip ayrışarak reaksiyonu polinükleotid sentezi yönünde iter.



Şekil 3.22 Polinükleotidlerin sentezi Nükleozid trifosfatlar, büyüyen bir polinükleotidin 3′ ucuna bağlanırlar ve bir pirofosfat serbestleşir.

ÖZET

Metabolik Enerji ve ATP

- ***Serbest enerji ve ATP:*** ATP, hücrelerde enerji gerektiren reaksiyonları sürükleyen serbest enerji deposu olarak işlev görür.

- ***Glikoliz ve Krebs döngüsü:*** Glukozun yıkılması hücresel enerjinin temel kaynağını oluşturur. Glikoliz, tüm hücrelerde glukoz yıkılımının ilk evresidir. Aerobik hücrelerde, glukozun oksitlenmesi, 36-38 molekül ATP üreten Krebs döngüsü ile tamamlanır. ATP'nin çoğu, O_2'nin H_2O'ya indirgendiği elektron taşıma reaksiyonları ile türetilir. Bkz. **Animasyonlar 3.1** ve **3.2.**

- ***Lipidlerden enerji elde edilmesi:*** ATP, glukoz dışındaki organik moleküllerin yıkılımından da türetilebilir. Yağlar karbohidratlardan daha fazla indirgenmiş olduklarından, daha verimli bir enerji depo formu oluştururlar.

Elektron Taşınımı ve Oksidatif Fosforilasyon

- ***Elektron taşıma zinciri:*** Oksidatif metabolizmadan elde edilen enerjinin büyük bölümü elektronların NADH ve $FADH_2$'den O_2'ye taşınmasından sağlanır. Bu enerjiyi kullanılabilir formda toplamak için elektronlar, mitokondri iç zarındaki dört protein kompleksinde yer alan bir dizi taşıyıcıdan geçirilir.

- ***Kemiozmotik kenetlenme:*** Elektron taşınımının enerji üreten reaksiyonları, mitokondri iç zarının iki tarafında bir proton gradienti oluşmasıyla eşlenir. Bu gradientte depolanan potansiyel enerji, protonların mitokondriye enerjetik olarak tercih edilen geri dönüşünü ATP sentezine kenetleyen beşinci bir kompleksi olan ATP sentaz tarafından toplanır. Bkz. **Video 3.1.**

Fotosentez

- ***Elektron taşınması:*** Organik moleküllerin sentezi için gereken enerji, en uçta, bitkiler ve fotosentetik bakteriler tarafından güneş ışığından elde edilir. Fotosentezin ilk evresinde, güneş ışığından gelen enerji ATP ve NADPH'ın sentezini ilerletmek için kullanılır. Bu H_2O'un O_2'e yükseltgenmesi ile kenetlenmiştir. Bu reaksiyonlarda açığa çıkan ATP ve NADPH daha sonra, CO_2 ve H_2O'dan glukoz sentezinde kullanılır. Güneş ışığının enerjisi klorofiller tarafından soğurularak, elektronlar daha yüksek bir enerji durumuna uyarılır. Bu yüksek-enerjili elektronların daha sonra bir dizi zar taşıyıcısından geçirilir. Bu, ATP'nin sentezi ve $NADP^+$'nın NADPH'a indirgenmesi ile kenetlenmiştir. Bkz. **Animasyon 3.3.**

- ***ATP sentezi:*** ATP'nin kemiosmotik sentezi bir proton gradienti ile ilerler.

- ***Glukoz sentezi:*** Hem ATP hem de NADPH, kloroplastlarda CO_2'den glukoz sentezinde kulanılır. Bkz. **Animasyon 3.4.**

Hücre Bileşenlerinin Biyosentezi

- ***Karbohidratlar:*** Glukoz, diğer organik moleküllerden, enerji ve indirgeyici kuvvet olarak sırasıyla, ATP ve NADH'ın kullanılması ile sentezlenebilir. Basit şekerlerden polisakkaridlerin sentezi için ilave ATP'ye gereksinim vardır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

Gibbs serbest enerji (*G*), adenozin 5'-trifosfat (ATP), yüksek-enerjili bağ

glikoliz, koenzim A (CoA-SH), sitrik asit döngüsü, Krebs döngüsü, flavin adenin dinükleotid ($FADH_2$)

elektron taşıma zinciri, koenzim Q, übikinon, sitokrom *c*, sitokrom oksidaz, oksidatif fosforilasyon

kemiosmotik kenetlenme, elektrokimyasal gradient, ATP sentaz

ışık reaksiyonları, karanlık reaksiyonlar, klorofil, fotomerkez, fotosistem I, fotosistem II, sitokrom *bf* kompleksi, NADP redüktaz, döngüsel elektron akışı

Calvin döngüsü

glukoneogenez

ÖZET

- ***Lipidler:*** Lipidler, karbohidratların yılıkması ile elde edilen asetil CoA'dan sentezlenir.
- ***Proteinler:*** Amino asitler, glikoliz ve sitrik asit döngüsünün ara bileşiklerinden sentezlenirler. Proteinleri oluşturmak üzere polimerleşmeleri için, ATP ve GTP formunda ilave enerji gereklidir.
- ***Nükleik Asitler:*** Pürin ve pirimidin nükleotidleri, karbohidratlardan ve amino asitlerden sentezlenir. DNA ve RNA'ya polimerleşmeleri aktif öncüler olan, nükleozid trifosfatların kullanılması ile mümkün olur.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

azot fiksasyonu

Atıf

Hücre

Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Sorular

1. Birçok biyokimyasal mekanizma fizyolojik koşullarda ($\Delta G^{\circ\prime} > 0$) enerjetik yönden elverişsizdir. Hücre bu tepkimeleri nasıl gerçekleştirir?
2. Aşağıdaki reaksiyonu inceleyiniz:

   Fruktoz-6-fosfat + HPO_4^{2-} $\rightleftharpoons$ Fruktoz-1,6-bifosfat + H_2O,

   $\Delta G^{\circ\prime}$ = +4 kcal/mol.

   ATP hidrolizi için standard serbest enerji değişiminin (-7,3 kcal/mol), olduğunu göz önüne alarak, fosfofruktokinaz tarafından katalizlenen tepkimenin standart serbest enerji değişimini hesaplayınız.
3. Aşağıdaki reaksiyonu inceleyiniz:

   A $\rightleftharpoons$ B + C reaksiyonunda, $\Delta G^{\circ\prime}$ = +3,5 kcal/mol'dür, A'nın konsantrasyonu 10^{-2} M ve B ile C 'nin her ikisinin konsantrasyonları 10^{-3} M ise, hücre içi koşullarda ΔG'yi hesaplayınız. Reaksiyon hücre içinde hangi yönde ilerleyecektir? Hesaplamanız için: R = 1,98 x 10^{-3} kcal/mol / derece ve
   T = 298 K (25°C). Not: $\ln(x) = 2.3\log_{10}(x)$.
4. Glikoliz, ATP'nin hücre-içi konsantrasyonunun artmasından nasıl etkilenecektir?
5. Maya, hem anaerobik hem de aerobik koşullarda çoğalabilmektedir. Bir maya için anaerobik ve aerobik ortamda büyümesine göre tüketilen her glukoz molekülü için kaç adet ATP molekülü üretilecektir?
6. Anaerobik organizmalar, glikoliz sırasında üretilen NADH'dan NAD^+'yı nasıl geri kazanırlar?
7. Neden lipidler, karbohidratlardan daha verimli enerji depo molekülleridir?
8. İç mitokondri zarının iki tarafındaki elektrik potansiyelinin kaybolduğunu ve elektrokimyasal gradientin yalnızca bir pH birimlik bir proton konsatrasyon gradientinden ibaret olduğunu farz ediniz. Bu gradientte depolanan serbest enerjiyi hesaplayınız. Hesaplamanızda R = 1.98×10^{-3} kcal/mol/deg, T = 298°K (25°C) kullanın ve $\ln(x) = 2.3 \log_{10}(x)$ olduğuna dikkat ediniz.
9. Elektron taşıma zincirinde koenzim Q ve Sitokrom *c*'nin rolleri nelerdir?

10. Fotosentezde, altı molekül O_2 yapımıyla kenetlenen, bir molekül glukoz üretimi için kaç yüksek enerjili elektron gerekir? Bu elektronların fotosistem I ve II'den geçişi sonucunda kaç molekül ATP ve NADPH oluşturulur?
11. Fotosentezin ışık reaksiyonları ve karanlık reaksiyonları arasındaki farkları belirtiniz.
12. Neden glukoneogenez glikolizin basitçe tersine dönüşümü değildir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar (Her ana bölüm için en önemli anahtar derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Metabolik Enerji ve ATP

Krebs, H. A. 1970. The history of the tricarboxylic cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14: 154-170. [R]

Nicholls, D. G. and S. J. Ferguson. 2013. *Bioenergetics.* 4th ed. London: Academic Press.

Elektron Taşınımı ve Oksidatif Fosforilasyon

Baradaran, R., J. M. Berrisford, G. S. Minhas and L. A. Sazanov. 2013. Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 494: 443-448. [P]

Mitchell, P. 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic conse quences. *Science* 206: 1148-1159. [R]

Mitchell, P. 2011. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966. *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 1507-1538. [P]

Racker, E. 1980. From Pasteur to Mitchell: A hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc.* 39: 210-215. [R]

Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283: 1488-1493. [R]

Sazanov, L. A. 2015. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 375-388. [R]

Watanabe, R. and H. Noji. 2013. Chemomechanical coupling mechanism of F1-ATPase: catalysis and torque generation. *FEBS Letters* 587: 1030-1035. [R]

Fotosentez

Arnon, D. I. 1984. The discovery of pho tosynthetic phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 9: 258-262. [R]

Baniulis, D., E. Yamashita, H. Zhang, S. S. Hasan and W. A. Cramer. 2008. Structure-function of the cytochrome b_6f complex. *Phytochem Phytobiol.* 84: 1349-1358. [R]

Calvin, M . 1962. The path of carbon in photosynthesis. *Science* 135: 879-889. [R]

Kargul, J., J. D. J. Olmos and T. Krupnik. 2012. Structure and function of photo system I and its application in biomimetic solar-to-fuel systems. *J. Plant Physiol.* 169: 1639-1653. [R]

Schöttler, M. A., C. A. Albus and R. Bock. 2011. Photosystem I: its biogenesis and function in higher plants. *J. Plant Physiol.* 168: 1452-1461. [R]

Vinyard, D. J., G. M. Ananyev and G. C. Dismukes. 2013. Photosystern II: thereaction center of oxygenic photosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 82: 577-606. [R]

Hücre Bileşenlerinin Biyosentezi

Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer. 2010 . *Biochemistry.* 7th ed. New York: W. H. Freeman.

Canfield, D. E., A. N. Glazer and P. G. Falkowski. 2010. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science* 330: 192-196. [R]

Nelson, D. L. and M . M. Cox. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 6th ed. New York: W. H. Freeman

BÖLÜM 4

Moleküler Biyolojinin Temelleri

Kalıtım, Genler ve DNA 111

Genetik Bilginin Ekspresyonu 119

Rekombinant DNA 126

Nükleik Asitlerin ve Proteinlerin Saptanması 135

Ökaryotlarda Gen Fonksiyonu 142

Anahtar Deney
DNA Provirüs Hipotezi 125

Anahtar Deney
RNA İnterferens 151

Çağdaş moleküler biyoloji öncelikli olarak, hücre yapı ve işlevini yöneten genetik bilginin aktarımı ve ekspresyonundan sorumlu mekanizmaları anlamaya çalışır. Bölüm I'de özetlendiği gibi, tüm hücrelerin ortak temel özellikleri vardır ve hücre biyolojisindeki bu bütünlük, özellikle moleküler düzeyde belirgin olarak ortaya çıkar. Bu bütünlük, bilim insanlarının, *E. coli* ve insan gibi birbirlerinden olabildiğince ayrı organizmaların benzer moleküler mekanizmaları kullandıkları düşüncesi ile araştırmalarda bakteri gibi basit organizmaları model olarak seçmelerine yol açmıştır. Birçok araştırma bu varsayımın geçerliliğini kanıtlamış ve hücre moleküler biyolojisi, hücre davranışlarının farklı yönlerinin anlaşılmasında ortak bir tema sağlamıştır.

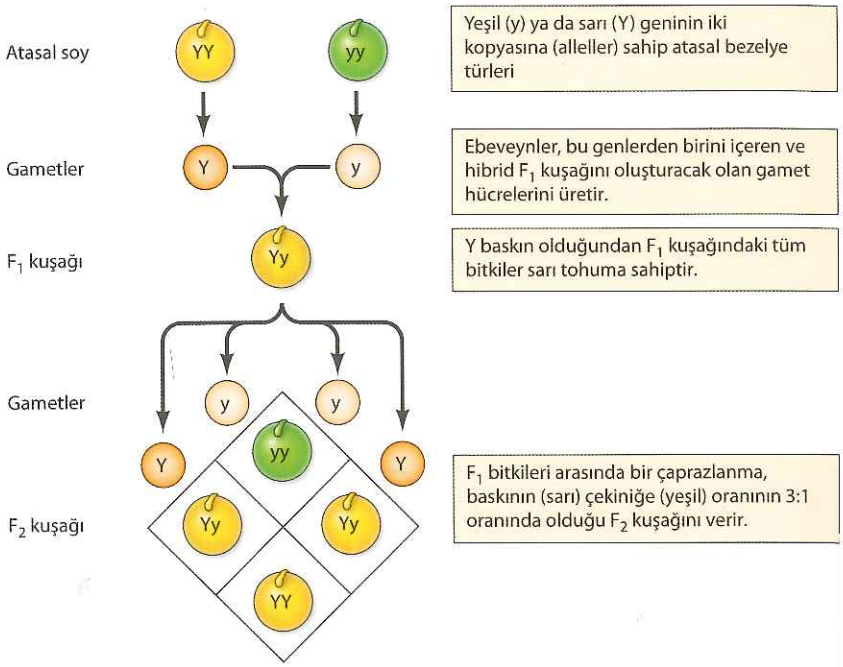
Moleküler biyolojideki ilk gelişmeler, *E. coli* ve virüsler gibi, hızlı çoğalan ve kullanışlı basit bakterilerin ve virüslerin incelenmesi ile elde edilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi pek çok deneysel çalışmanın önce prokaryotlarda yapılmasını ve daha sonra ökaryot hücrelere uyarlanmasını sağlamıştır. Bu teknoloji, başlangıçta sınırlı sayıda ökaryot genlerinin saptanması ve özelliklerinin ortaya konmasına odaklanmış olmakla birlikte, çok yakın geçmişte tüm hücresel genomların dizilerinin belirlenmesine imkan vermiştir. Moleküler biyolojinin erken gelişimi, rekombinant DNA ve ökaryotik genlerin fonksiyonlarının aydınlatılmasında kullanılan deneysel yaklaşımlar bu bölümde tartışılmaktadır.

Kalıtım, Genler ve DNA

Bütün canlıların en temel özelliği, kendilerini çoğaltabilme yeteneklerinin olmasıdır. Tüm organizmalar, kendi yapı ve işlevlerini belirleyecek genetik bilgiyi ebeveynlerinden kalıtırlar. Bütün hücreler, daha önce var olan hücrelerden köken aldığı için, genetik materyal kopyalanmalı ve her hücre bölünmesi sırasında yavru hücreye aktarılmalıdır. Genetik materyalin nasıl kopyalandığı ve gerek hücreden hücreye, gerekse organizmadan organizmaya nasıl aktarıldığı, biyolojinin ana sorusunu oluşturur. Bu bağlamda, genetik materyalin DNA olduğunun belirlenmesi ve genetik bilginin aktarılma mekanizmalarının çözümlenmesi, bugün biyolojiyi moleküler düzeyde anlamamızı sağlayan temel keşiflerdir.

Genler ve kromozomlar

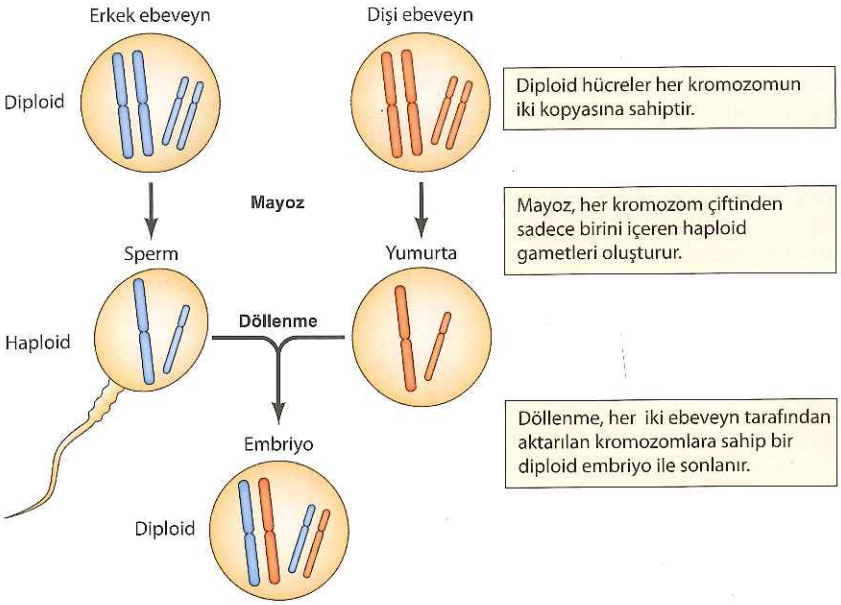
Genetiğin temel kuralları Gregor Mendel'in 1865 yılında, yapmış olduğu bezelye yetiştirme deneylerine dayanmaktadır. Mendel, tohumların rengi gibi bir dizi iyi



Şekil 4.1 Baskın ve çekinik genlerin kalıtımı

tanımlanmış karakterin kalıtımını incelemiş ve aktarımları konusunda genel kurallar oluşturabilmiştir. Mendel, her bir karakterin aktarımından sorumlu bir çift kalıtsal faktör olduğunu (bugün **genler** olarak biliniyor) varsayarak, her olguda bir sonraki kuşakta gözlenecek kalıtım kalıbını doğru olarak belirleyebilmiştir. Her bir karakteri belirleyen gen çiftinden (**allel** denir) her biri bir ebeveynden gelir. Örneğin, biri yeşil diğeri sarı bezelyeyi oluşturacak iki farklı bezelye türünün birbirleri ile döllenmesi aşağıdaki sonuçları doğuracaktır (Şekil 4.1). Sarı (*Y*) ve yeşil (*y*) tohum karakterini belirleyen genlerden birbirine eş iki tane içeren ebeveyn türler birbirleri ile çaprazlandığında, oluşacak yavru hücre bir kopya sarı (*Y*) ve bir kopya da yeşil (*y*) tohum karakterini birlikte bulunduran bir melez olacaktır. Melez yapıdaki bu ilk kuşak bezelyeler (birinci filial F_1 kuşağı) tamamen sarı olarak gözlendiğine göre, sarı olma özelliğinden sorumlu (*Y*) geninin, yeşil olma özelliğinden sorumlu (*y*) geni üzerinde **baskın** (dominant) bir etkiye sahip olduğu kabul edilir, (*y*) geni ise **çekinik** (resesif) olarak adlandırılır. F_1 kuşağında genetik yapı (**genotip**) *Yy*, fiziksel görünüm ise **(fenotip)** sarı olacaktır. Eğer F_1 kuşağındaki yavru hücreler birbirleri ile çiftleştirilecek olursa, yavru kuşakta (F_2 kuşağı) sarı bezelyeler ile yeşil bezelyelerin dağılımı, sarı tohumlu F_2 bitkileri ile yeşil tohumlular arasında 3:1 tipik oranını verir.

Mendel'in bulguları çağının çok ötesindeydi ve Mendel yasaları yeniden keşfedildiği 1900 yılına kadar büyük ölçüde göz ardı edildi. Mendel yasalarının öneminin yeniden kavranmasından kısa bir süre sonra, genlerin taşıyıcısı olarak **kromozomların** rolü öne sürüldü. Yüksek organizasyona sahip bitki hücrelerinin pek çoğunun, her bir kromozomdan birbirine eş iki kopya içerdiği, yani **diploid** yapıda oldukları görüldü. Eşey hücrelerinin (sperm ve yumurta) oluşumunda ise, her yavru hücreye eş kromozom çiftlerinden sadece birinin aktarıldığı, özel bir tip hücre bölünmesi **(mayoz)** görülür (Şekil 4.2). Sperm

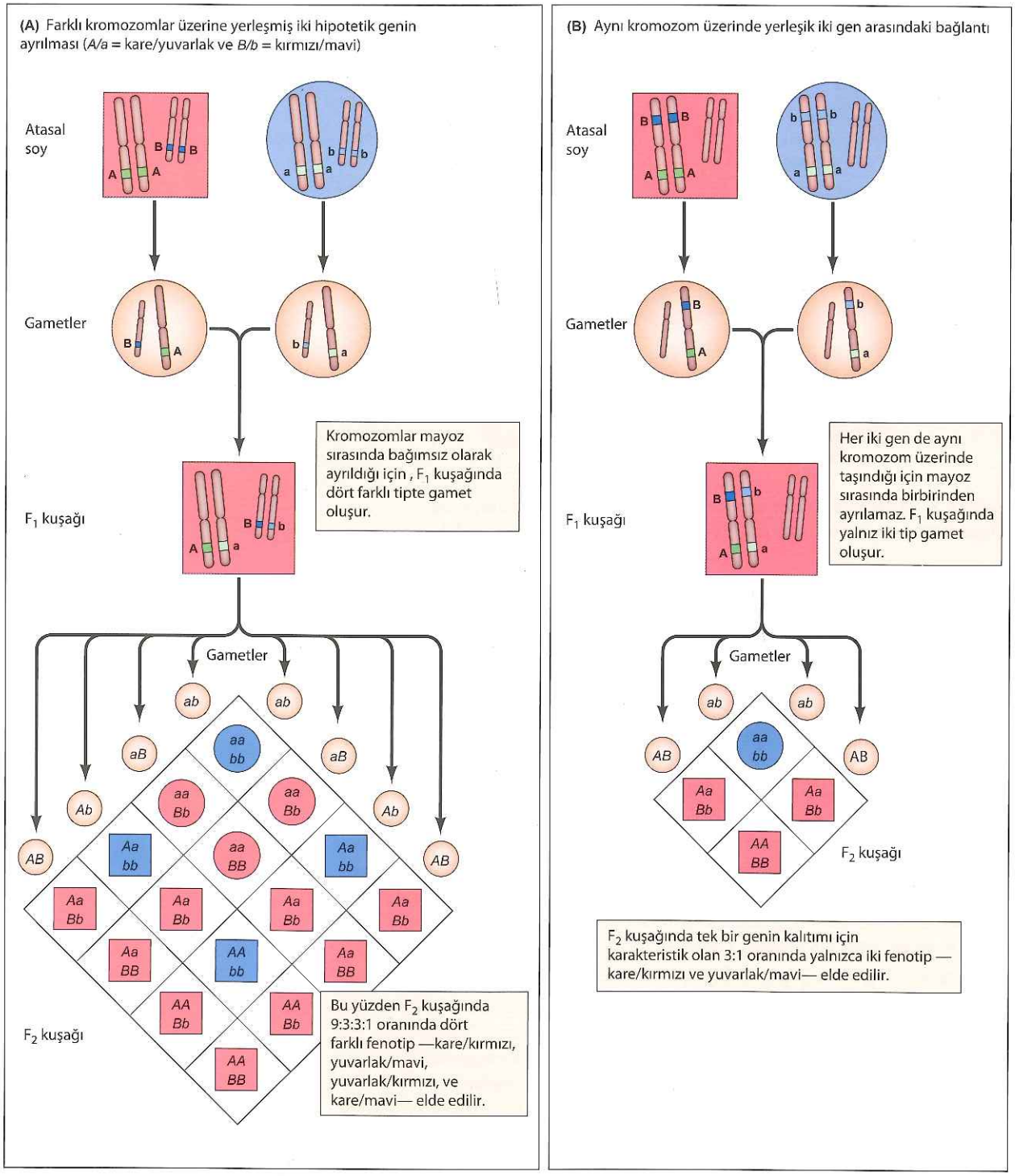


Şekil 4.2 Mayozda ve döllenmede kromozomlar Hipotetik bir organizma üzerinde kromozom çiftinin davranışı gösterilmiştir.

ve yumurta **haploid**'dir, yani her bir kromozomdan yalnızca bir kopya içerir. Bu iki haploid hücrenin döllenme sırasında birleşmesi ile, her kromozom çiftinin dişi ve erkek ebeveynlerden gelen birer kopyasına sahip, diploid yeni bir organizma oluşur. Bu bulgu, kromozom çiftlerinin davranışının, genlerin davranışına paralellik gösterdiğini kanıtlamış ve kromozomların, genleri taşıyan yapılar olduğu sonucuna varılmıştır.

Mutasyonun temeli, genetik bağlantı ve genler ile kromozomlar arasındaki ilişkilere ait bilgilerimiz, büyük oranda, meyve sineği, *Drosophila melanogaster* ile yapılan deneylerden elde edilmiştir. *Drosophila*'ların laboratuvarda kolaylıkla üretilmesi, genetik çalışmalar için eşsiz bir imkan yaratmaktadır. Bu özellikleri ile *Drosophila*, gelişim ve farklılaşmanın genetik analizi çalışmaları için, ilk ve devamlı bir seçenek haline gelmiştir.

1900'lü yılların başlarında *Drosophila*'da göz rengi, kanat yapısı gibi, rahatlıkla gözlenebilecek karakterlerin oluşmasına katkıda bulunan bir dizi genetik değişiklik **(mutasyon)** belirlenmişti. Üretme çalışmaları bu karakterlerden sorumlu olan genlerden bazılarının birbirlerinden bağımsız olarak kalıtıldığını gösterdi, bu da bu genlerin mayozda birbirlerinden bağımsız dağılan farklı kromozomlar üzerinde yerleşik olduğunu desteklemektedir (**Şekil 4.3**). Buna karşın, diğer bazı genler, sıklıkla, bir çift özellik şeklinde, birlikte kalıtılırlar. Bu tip genler aynı kromozom üzerinde birbirlerine çok yakın olarak yerleştiklerinden, birbirleri ile bağlı genler olarak adlandırılırlar. Bağlı gen gruplarının sayısı ile toplam kromozom sayısının (*Drosophila*'da dört) eşit olması, kromozomların genleri taşıdığı fikrini desteklemektedir. 1915 yılına kadar, *Drosophila*'nın dört kromozomu üzerinde yaklaşık 100 kadar gen tanımlanmış ve haritalanmıştır, bu da kromozomların kalıtımın temel taşı olduğu yönündeki görüşün genel olarak kabul görmesine yol açmıştır.



Şekil 4.3 Genlerin kuşaklar arası dağılımı ve bağlantı

Genler ve enzimler

İlk genetik çalışmalar, *Drosophila*'nın göz rengi gibi, kolaylıkla gözlenebilecek özelliklerden sorumlu genlerin tanımlanması ve kromozomal yerleşimlerinin saptanmasına odaklandı. Ancak bu genlerin ilgili fenotipleri nasıl oluşturduğu açık değildi. Genler ve enzimler arasındaki ilişkiye dikkat çeken ilk bulgular, 1909 yılında fenil alanin amino asidi metabolizmasındaki bir genetik bozukluğa bağlı olarak ortaya çıkan kalıtsal fenilketonüri hastalığının saptanması ile elde edildi. Bu genetik kusurun, uygun metabolik reaksiyonu katalizlemek için gerekli enzimin eksikliğinden kaynaklandığı varsayılmış ve bu bulgu genlerin enzimlerin sentezini sağladığı genellemesine yol açmıştır.

Enzim sentezi ile genlerin ilişkisi konusunda daha kesin bulgular 1941 yılında George Beadle ve Edward Tatum'un *Neurospora crassa* mantarı kullanarak yaptıkları çalışmalardan elde edildi. Laboratuvar koşullarında *Neurospora* mantarı, Bölüm 1'de *E. coli*'nin üretilmesi konusunda sözü edilen kısıtlı ve zenginleştirilmiş kültür ortamlarına benzer koşullarda üretilebilmektedir. *Neurospora* için kısıtlı kültür ortamı sadece tuz, glukoz ve biyotinden (bir B-kompleks vitamin) ibarettir; zenginleştirilmiş kültür ortamına ise, amino asitler, vitaminler, pürin ve pirimidinler eklenmektedir. Beadle ve Tatum zenginleştirilmiş ortamda üreyebilen ancak, kısıtlı kültür ortamında üreyemeyen mutant *Neurospora*'lar elde ettiler. Her bir mutantın üreyebilmek için, özel bir amino asit gibi, spesifik bir besin desteğine ihtiyacının olduğu saptandı. Ayrıca, kültür ortamına eklenmesi gereken bu besin desteği, mutantlarda o maddenin sentezinde bir bozukluk olması ile ilişkili idi. Bu yüzden, her bir mutasyon belirli bir metabolik yolda eksiklikle sonuçlanmaktadır. Bu metabolik yolların enzimler tarafından yönetildiği bilindiği için, bu deneylerin sonucunda her genin bir enzimin yapısını belirlediği sonucuna varıldı. Ek olarak, bazı genlerin proteinleri değil transfer veya ribozomal RNA'lar gibi fonksiyonel RNA'ları kodladığı bilinmektedir.

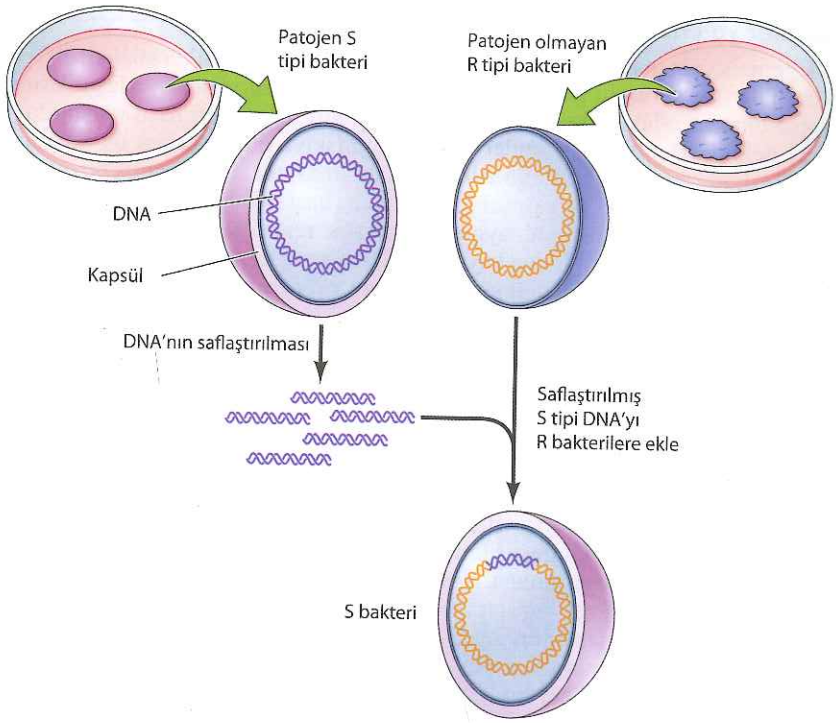
DNA'nın genetik materyal olduğunun belirlenmesi

Kalıtımın kromozomal temellerinin anlaşılması ve genler ile enzimler arasındaki ilişkilerin gösterilmesi, genin moleküler yapısını açıklamaz. Kromozomlar, DNA'nın yanı sıra proteinleri de içermektedir ve başlangıçta, genlerin aslında proteinler olduğu düşünülüyordu. DNA'nın genetik materyal olduğunun ilk kanıtı, bakteriler ile yapılan çalışmalardan elde edildi. Bölüm içinde daha sonra tartışılacağı gibi, bu deneyler genlerin fonksiyonlarını tanımlamaya yönelik yaklaşımlar için öncü niteliği taşımaktadır.

DNA'nın rolünü tanımlayan deneyler, pnömoni hastalığının etkeni olan bakteriler (*Pneumococcus*) ile yapılan çalışmalardan köken almaktadır. Virulan *Pneumococcus* suşlarının etrafı, konakçı bağışıklık sisteminin saldırılarından kendisini koruyacak polisakkarit bir kapsül ile çevrelenmiştir. Bu kapsül bakterilere kültür ortamında düzgün görüntü kazandırdığı için, kapsüllü suşlar S formu (smooth) olarak adlandırılır. Kapsül oluşturma yeteneğini kaybetmiş olan mutant bakteri suşları ise, kültür ortamında girintili çıkıntılı kenarları olan koloniler oluştururlar (rough, R) ve fareye verildiklerinde öldürücü değildirler. Kapsülsüz (R) bakteriler ile ısıtılarak öldürülmüş kapsüllü (S) bakteriler birlikte fareye verildiğinde, farede pnömoni geliştiği ve farenin öldüğü 1928 yılında gözlenmiştir. İlginç olarak, bu farelerden izole edilen bakterilerin S tipi olduğu gözlenmiştir. Bunu izleyen deneylerde S bakterilerin bakteri hücresi içermeyen özütlerinin de, R bakterileri S tipine dönüştürme (transforme etme) yeteneklerinin olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, S bakterilerden elde edilen özütteki bir madde (dönüştüren madde adı verilen), bakterilerin R'den S tipine genetik dönüşümünü **(transformasyon)** uyarmaktan sorumludur.

Oswald Avery, Colin MacLeod ve Maclyn McCarty tarafından 1944 yılında ana dönüşüm maddesinin DNA olduğu, hem bakteri özütlerinden DNA eldesi, hem de ana dönüşüm maddesinin aktivitesinin proteinlerin enzimatik

Animasyon 4.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a4.1
Bakteriyel Transformasyon
Patojen olmayan bir *Pneumococcus* türü, patojen olan bir türe ait DNA fragmanını alıp kendi kromozomuna dahil ederek patojen bir türe dönüşebilir.



Şekil 4.4 Genetik bilginin DNA ile aktarılması Etrafı kapsül ile çevrili ve düz hatlı koloniler (S) oluşturan patojen *Pneumococcus* suşlarından DNA izole edilir. Hastalık yapma özelliği bulunmayan, kapsülsüz bakteri (rough=R koloni) kültürüne, saflaştırılmış S DNA'sının eklenmesi, S kolonilerin oluşması ile sonuçlanır. Saflaştırılan DNA, bakterilerin R tipinden S'ye dönüşmesinden sorumlu genetik bilgiyi taşımaktadır.

Animasyon 4.2
sites.sinauer.com/cooper7e/a4.2
Avery, MacLeod & McCarty
1944'de bir seri deney ile Oswald Avery, Colin MacLeod, ve Maclyn McCarty dönüşüm maddesinin (genetik materyal) DNA olduğunun belirlemişlerdir.

sindirimi ile değil, DNA'nın sindirimi ile ortadan kalktığının gösterilmesi ile belirlenmiştir (Şekil 4.4). Bu çalışmalar, DNA'nın genetik materyal olduğunun kabulüyle sonlanmamış, konu birkaç yıl içinde bakteri virüsleri ile yapılan çalışmalara doğru genişletilmiştir. Bu çalışmalarda, özetle, bir bakteri virüsü bir hücreyi enfekte ettiği zaman, virüsün çoğalabilmesi için hücreye viral proteinin değil viral DNA'nın girmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, yavru virüs partiküllerine, atasal viral DNA (protein değil) aktarılmaktadır. Bu sonuçlar ile bakteriyel transformasyonda DNA aktivitesinin rolünü açıklamaya yönelik süregelen çalışmaların uyumu, DNA'nın genetik materyal olduğu fikrinin kabul edilmesine yol açmıştır.

DNA'nın yapısı

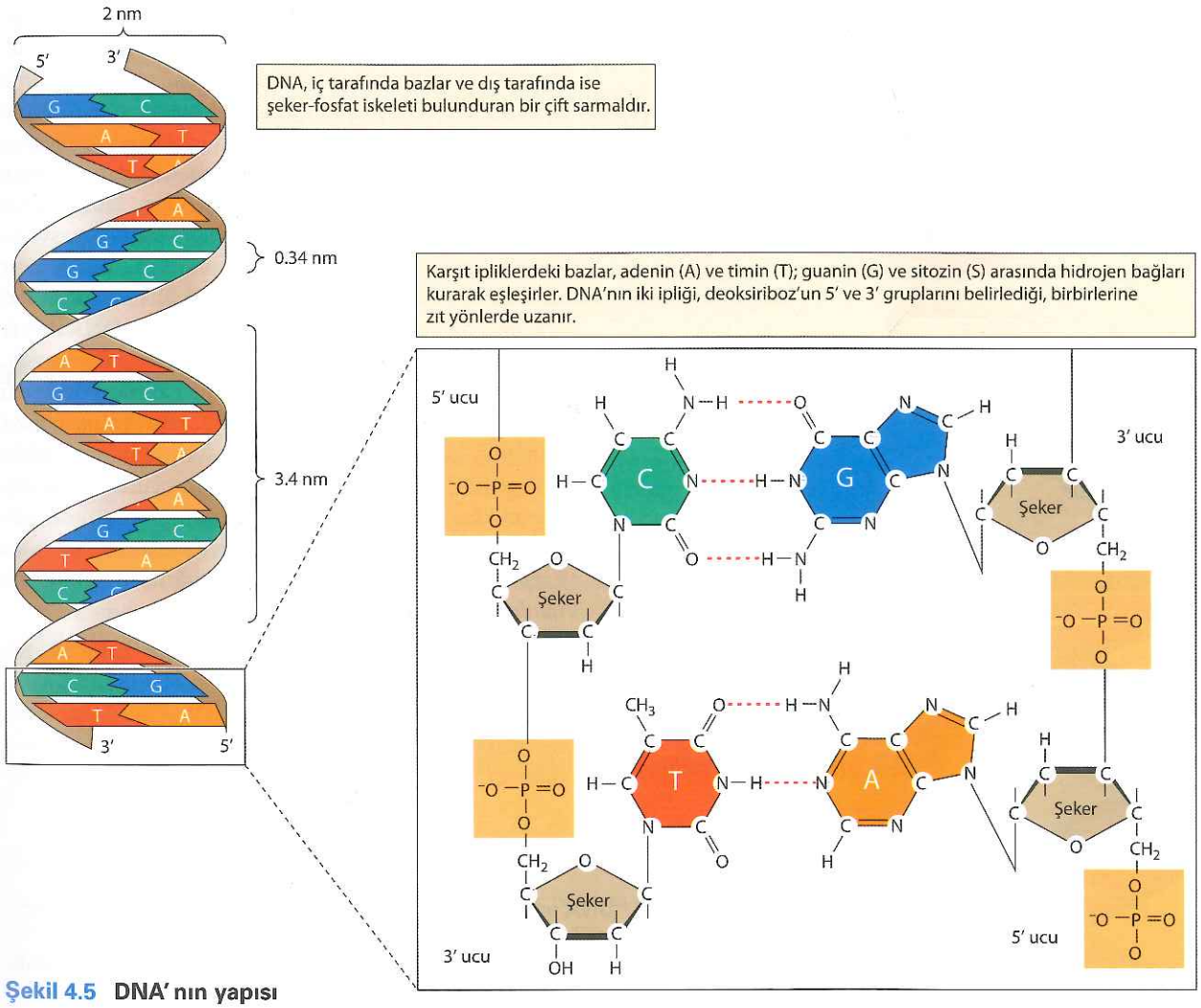
James Watson ve Francis Crick tarafından 1953 yılında belirlenen DNA'nın üç boyutlu moleküler yapısının anlaşılması, günümüzde moleküler biyolojinin temellerini oluşturmaktadır. Watson ve Crick'in çalışmaları ile, DNA'nın polimer yapısının, fosfatlanmış şeker molekülleri ile bağlantılı, iki primidin (sitozin [C] ve timin [T]) ve iki pürin (adenin[A] ve guanin [G]) olmak üzere dört nükleik asit bazından oluştuğu belirlenmişti. DNA'nın temel genetik materyal olarak rolü göze alındığında, DNA'nın üç boyutlu yapısının çözümlenmesi fonksiyonunun anlaşılabilmesi için kritik öneme sahipti. Watson ve Crick'in bu problem hakkındaki düşünceleri büyük oranda Linus Pauling'in hidrojen bağları

ve proteinlerin ikincil yapılarında sıklıkla gözlenen α-sarmal yapısına yönelik çalışmalardan etkilenmiştir (bkz. Bölüm 2). Bu verilere ek olarak, DNA'nın yapısında Maurice Wilkins ve Rosalind Franklin'in X-ışını kristalografisi çalışmaları ile elde edilen deneysel verileri de mevcuttu. Bu verilerin analizi ile DNA molekülünün her 3.4 nm'de bir dönen bir sarmal olduğu belirlendi. Bu veriler, aynı zamanda, komşu bazlar arasındaki mesafenin 0.34 nm olduğunu da göstermekteydi. Önemli bir diğer bulgu da, sarmal çapının yaklaşık 2 nm olduğu idi ve DNA sarmalının bir değil iki DNA ipliğinden oluştuğunu desteklemekteydi.

Bilgi İçin

DNA'nın Watson ve Crick tarafından tarif edilmiş olan yapısı önemli bir başarı olmakla birlikte mükemmel değildi. Onların ilk makalelerinden A-T ve G-C eşleşmesinin iki hidrojen bağı ile olduğu zannedilmiş, G-C arasındaki üçüncü bağ gözden kaçırılmıştır.

Watson ve Crick, DNA modellerini bu verilere dayanarak oluşturdular (Şekil 4.5). Bu modelin ana noktası, DNA'nın çift sarmal yapısının, molekülün dışında şeker-fosfat omurgası ile desteklenmesidir. DNA bazları içte yer alır, karşıt iplik üzerindeki pürin ve pirimidinler arasındaki hidrojen bağları ile bu yerleşimde tutulur. Baz eşleşmesi çok özgündür: A daima T ile ve G ise daima C ile eşleşir. DNA bazlarının bu özgün eşleşmesi, çeşitli DNA'ların baz bileşimini analiz eden ve adenin ve timin miktarlarının ve benzer şekilde guanin ve sitozin miktarlarının birbirlerine eşit olduğunu gösteren Erwin



Şekil 4.5 **DNA'nın yapısı**

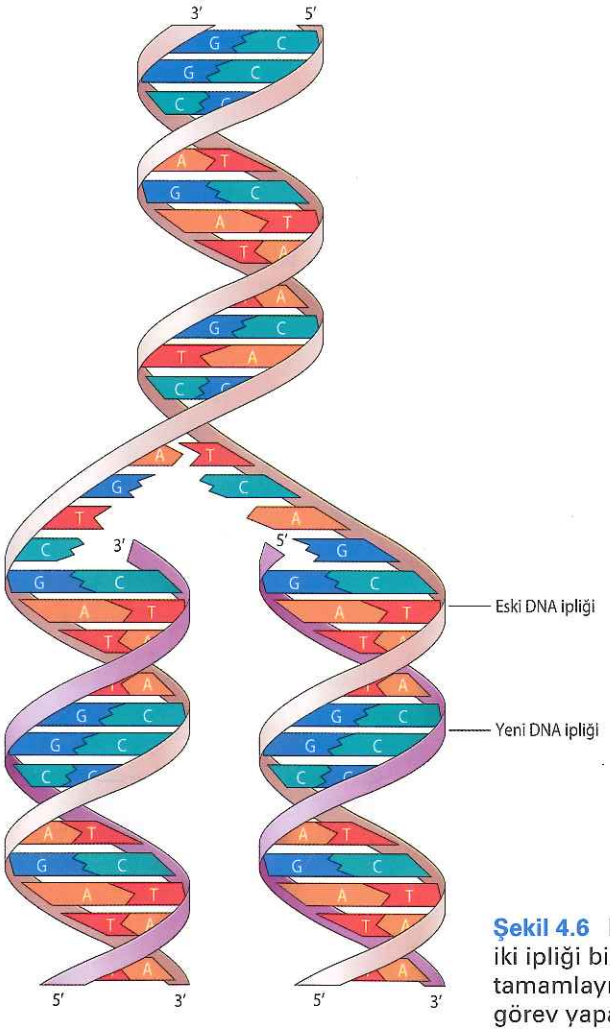
Chargaff'ın daha önceki bulguları ile tamamen uyumlu idi. Bu özgün baz eşleşmesi nedeniyle DNA'nın iki ipliği birbirinin tamamlayıcısıdır: Her iki iplik diğeri üzerindeki özgün baz dizisi için gerekli tüm bilgileri içerir.

DNA'nın replikasyonu

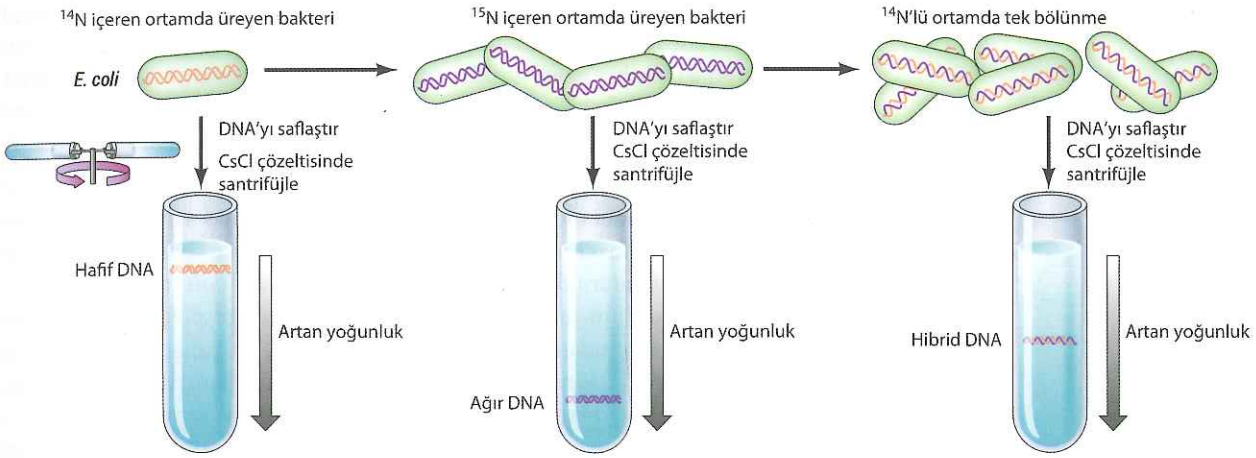
DNA iplikleri arasındaki tamamlayıcı baz eşleşmesinin keşfedilmesi, her hücre bölünmesinde gerekli olan, genetik maddenin kendi replikasyonunu nasıl yönlendirdiği sorusuna moleküler bir çözüm getirdi. Bir DNA molekülünün iki ipliğinin birbirinden ayrılabileceği ve yeni tamamlayıcı ipliğin sentezi için kalıp olabileceği fikri ileri sürüldü, diziyi özgün baz eşleşmesi belirleyecekti (**Şekil 4.6**). Bu işlem, her yeni DNA molekülünde atasal DNA ipliklerinden birisi korunduğu için, **yarı korunumlu replikasyon** olarak adlandırılmaktadır.

Yarı korunumlu DNA replikasyonu 1958 yılında Matthew Meselson ve Frank Stahl tarafından yapılan ve DNA'nın, yoğunluğunu değiştiren izotoplarla işaretlenmesine dayanan güzel bir deneyle desteklendi (**Şekil 4.7**). Bu deneyde *E. coli,* azotun normalde bulunan hafif izotopu (^{14}N) yerine, ağır izotopunun (^{15}N) bulunduğu bir ortamda üretildi. Bu bakterilerin ^{15}N içeren DNA'sı, ^{14}N'lü ortamda üretilen bakterilerinkine göre daha ağırdı. Bu ağır DNA, ^{14}N içeren DNA'dan CsCl yoğunluk gradienti denge santirfügasyonu ile ayırt edilebilmektedir. Bu şekilde, ağır (^{15}N) DNA'nın hafif (^{14}N) DNA'dan ayrıştırılabilme olanağı, DNA sentezinin deneysel olarak çalışılmasını olanaklı kıldı. ^{15}N ortamında üretilen DNA, ^{14}N içeren ortama aktarıldı ve bu ortamda bir kez daha replike olması sağlandı. Daha sonra DNA'ları izole edildi ve CsCl yoğunluk gradienti denge santirfügasyonu ile analiz edildi. Bu analizin sonuçları, bütün ağır DNA'nın, ağır (^{15}N) ile hafif (^{14}N) DNA moekülleri arasında bir yoğunluktaki, yeni sentezlenen DNA ile yer değiştirdiğini gösterdi. Bu bulgu replikasyon sırasında, ağır DNA'nın iki ipliğinin birbirinden ayrıldığı ve yeni sentezlenen hafif DNA molekülü için kalıp görevi gördüğü, sonuçta elde edilen çift iplikli molekülün orta yoğunlukta olduğu şeklinde yorumlandı. Bu deney böylelikle, DNA ikili sarmalında iplikler arasında baz eşleşmesinin önemini belirginleştiren ve yarı korunumlu DNA replikasyonunu doğrudan kanıtlayan ilk deney oldu.

DNA'nın, kendini kopyalamak için kalıp görevi yapma yeteneği, daha sonra *E. coli*'den saflaştırılan bir enzimin **(DNA polimeraz)** *in vitro* koşullarda DNA replikasyonunu katalizlediğinin gösterilmesi ile de kanıtlandı. DNA kalıbının bulunduğu ortamda, DNA po-



Şekil 4.6 DNA'nın yarı korunumlu replikasyonu Atasal DNA'nın iki ipliği birbirinden ayrılır ve her bir iplik yeni bir yavru ipliğin tamamlayıcı baz eşleşmesi yoluyla sentezlenmesi için kalıp olarak görev yapar.



Şekil 4.7 Yarı korunumlu replikasyonun deneysel olarak gösterimi Azotun normal izotopunu (^{14}N) içeren ortamda üretilen bakteri, ağır izotopu (^{15}N) içeren ortama aktarılır ve bu ortamda birkaç kuşak boyunca üretilir. Bakteriler daha sonra tekrar ^{14}N içeren besi yerine alınır ve bir nesil daha üretilir. Bu bakterilerden elde edilen DNA, CsCl çözeltisinde denge ultrasantrifügasyonuna tabi tutularak analiz edilir. CsCl çökeltileri bir yoğunluk gradienti yapar ve DNA molekülleri yoğunluklarının CsCl çözeltisi ile eşit olduğu pozisyonda band oluşturur. ^{15}N' den ^{14}N' e transfer edilen bakteri DNA' ları, ^{15}N ve ^{14}N'lü DNA' ların arasındaki bir yoğunlukta bandlar verir. Bu da, biri hafif diğeri ağır olmak üzere iki iplikli melez bir molekül oluştuğunu gösterir.

limeraz, nükleotidlerin tamamlayıcı DNA molekülüne eklenmesini sağlayabiliyordu.

Genetik Bilginin Ekspresyonu

Genlerin çoğu, enzimatik aktiviteleri ile hücre metabolizmasını yönlendirmekten sorumlu proteinlerin yapısını belirleyerek etkisini gösterir. DNA'nın genetik materyal olduğunun bulunması ve yapısının ortaya konulması ile genetik bilginin, DNA molekülünü oluşturan dört bazın (A, C, G ve T) belli bir düzende sıralanması ile özelleştiği ortaya çıkarılmıştır. Proteinler ise, dizilimleri yapı ve fonksiyonlarını belirleyen 20 amino asitin polimerleridir. Genetik mutasyonlar ile, bir proteinin amino asit dizilimindeki bir değişiklik arasındaki ilişkiyi gösteren ilk doğrudan bağlantı, 1957 yılında, kalıtsal bir hastalık olan orak hücreli anemi hastalarının hemoglobin moleküllerinin, tek bir amino asit değişikliği ile normallerden farklı olduğunun gösterilmesi ile bulunmuştur. Ancak, DNA ve proteinler arasındaki moleküler ilişkilerin daha iyi anlaşılmasında, *E. coli* ve virüslerinin genetik model olarak kullanıldığı bir dizi deney önemli olmuştur.

Genler ile proteinler arasında doğrusal ilişki

Genler ile enzimler arasındaki ilişkiyi açıklayan en basit hipotez, DNA'daki nükleotid diziliminin bir proteindeki amino asit sırasını belirlemesidir. Bir gendeki mutasyonlar, bir nükleotidin diğerine değişmesi ya da nükleotidlerin kaybı veya eklenmesi sonucunda oluşan DNA dizilimi değişiklikleridir. DNA'nın

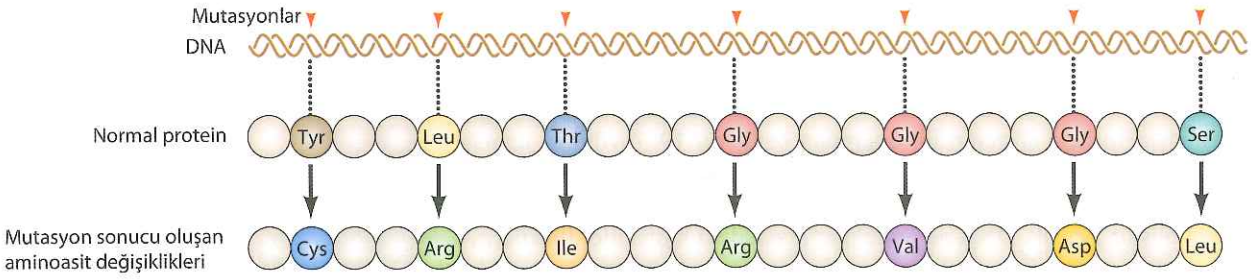
nükleotid dizilimindeki bu değişiklikler, ilgili genin kodladığı proteinin amino asit diziliminde de, buna karşılık gelen bir değişikliğe yol açabilmektedir. Bu hipoteze göre, tek bir genin farklı mutasyonları, kodlanan proteindeki farklı amino asitleri değiştirebilir ve gen üzerindeki mutasyonun yerleşimi kodlanan protein üzerindeki amino asit değişiminin pozisyonu yansıtmalıdır.

E. coli'nin hızlı çoğalma potansiyeli ve basit genetik sistemi bu soruyu cevaplamaya yardımcı oldu. Çoğalmak için belli bir amino asit gereksinimine ihtiyaç duyan besinsel mutantları da içeren (bölümün başında tartışılan *Neurospora* mutantlarındaki gibi) değişik sayıda *E. coli* mutantları elde edilebilir. *E. coli*'nin hızlı üremesi tek bir gendeki çoklu mutantların izolasyonunu ve haritalanmasını kolaylaştırdığı için, bu çalışmalar genler ve proteinler arasındaki doğrudan ilişkinin ilk gösterimini sağladı. Bu çalışmalarda, Charles Yanofsky ve arkadaşları triptofan amino asitinin sentezi için gerekli olan enzimi kodlayan gende bir dizi mutasyon haritaladılar. Mutant genler tarafından kodlanan enzimlerle yapılan çalışmalar, bunlarda oluşan amino asit değişikliklerinin gende bu amino asitlere karşılık gelen mutasyonlarla aynı olduğunu ortaya koydu (**Şekil 4.8**). Böylece, proteindeki amino asit dizisinin gendeki mutasyon ile paralellik gösterdiği, daha önce de öngörüldüğü gibi, DNA'daki özgün nükleotidlerin proteindeki amino asit diziliminden sorumlu olduğu varsayımı doğrulanmış oldu.

Mesajcı RNA'nın rolü

DNA'daki nükleotid dizisinin proteindeki amino asit dizisini belirlediği ispatlanmış olmakla birlikte bu, DNA'nın doğrudan protein sentezini yönettiği anlamına gelmez. Zaten, DNA hücrede çekirdek içinde yerleşik olmasına karşılık protein sentezi sitoplazmada gerçekleştiği için, buna olanak yoktur. Bu nedenle genetik bilgiyi DNA'dan protein sentezinin gerçekleştiği bölgelere (ribozomlara) ulaştıracak bir aracı gereklidir.

DNA'ya olan yapısal benzerliği nedeni ile, bir DNA kalıbından sentezlendiği düşünülen RNA molekülü, bu aracı molekül için en yakın aday gibi görünüyordu (**Şekil 4.9**). RNA molekülü DNA molekülünden, çift iplikli değil tek iplikli oluşu, şeker içeriğinin deoksiriboz yerine riboz olması ve primidin



Şekil 4.8 Genlerle proteinler arasında doğrusal ilişki *E. coli*'de triptofan sentetazın kodlayan gende bir dizi mutasyon (okla gösterilmiş noktalar) gösterilmiştir. Her bir mutasyon sonucunda oluşan amino asit değişiklikleri daha sonra, mutant bakteri proteinlerinin dizi analiziyle tanımlanmıştır (normal dizi üst, mutant dizi alt sırada gösterilmiştir). Bu çalışmalar, DNA' daki mutasyonların sırasının, bu genden kodlanan proteindeki amino asit değişikliklerinin sırasıyla aynı olduğunu göstermiştir.

bazı olan Timin (T) yerine Urasil (U) içermesi ile ayrılmaktadır (bkz. Şekil 2.10). Bununla birlikte, ne şeker yapısındaki değişiklik ne de Timin yerine Urasil geçmiş olması, beklenen baz eşleşmelerini etkilemez. Dolayısıyla RNA sentezi doğrudan bir DNA kalıbı tarafından yönlendirilebilir. Buna ek olarak, RNA molekülü çoğunlukla sitoplazma içinde yerleşik olduğu için, DNA'dan ribozomlara bilgi taşıyan aracı olması akla yatkındı. RNA'nın bu özellikleri, moleküler biyolojide **ana dogma** (*central dogma*) olarak bilinen genetik bilgi akışı için bir yolak önerilmesini sağladı:

$$\text{DNA} \rightarrow \text{RNA} \rightarrow \text{Protein}$$

Bu anlayışa göre, RNA molekülleri kalıp DNA'dan sentezlenmektedir (bu süreç **transkripsiyon** olarak adlandırılır) ve proteinler de RNA kalıbından sentezlenmektedir (bu süreç translasyon (**proteine çevirim**) olarak adlandırılır).

Ana dogmaya göre, varsayılan RNA aracılarının deneysel kanıtı, Sidney Brenner, Francois Jacob ve Matthew Meselson tarafından T4 bakteriyofajı ile enfekte edilmiş *E. coli* çalışmalarından elde edildi. *E. coli* RNA'sının sentezinin, T4 fajı ile enfeksiyon oluştuktan sonra durduğu ve enfekte bakteride yeni sentezlenen RNA'nın sadece T4 DNA'sını kalıp aldığı gözlendi. Yeni oluşan bu T4 RNA, bakteri ribozomları ile bağlanmakta, böylece bilgi, DNA'dan protein sentezinin olduğu bölgeye iletilmekteydi. Genetik bilginin aktarılmasında aracı molekül olan ve protein sentezi için kalıp rolü oynayan bu RNA molekülü, **mesajcı RNA (mRNA)** olarak adlandırılmıştır. Kalıp DNA'dan RNA'nın sentezlenmesi işlemi bir enzim **(RNA polimeraz)** tarafından katalizlenmektedir.

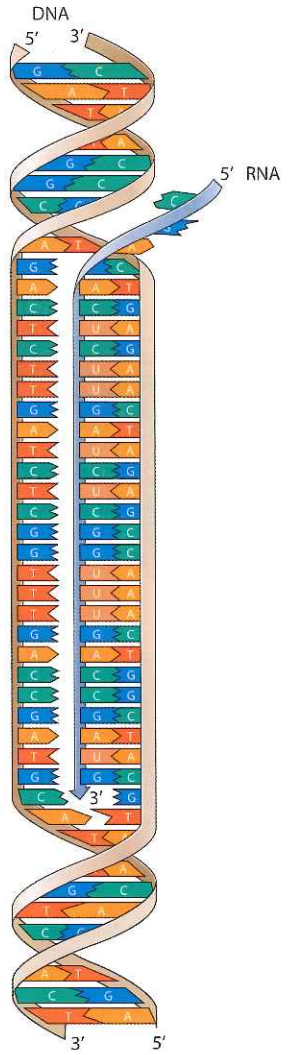
mRNA'ya ek olarak, diğer iki RNA tipi, protein sentezinde önemli rol oynar. **Ribozomal RNA (rRNA)** ribozomların bir elemanı olarak, **taşıyıcı RNA (tRNA)** ise mRNA kalıbındaki bilgiye uygun amino asitlerin sıralanması için adaptör olarak iş görür. Bu moleküllerin yapı ve fonksiyonlarına aşağıda değinilmekle birlikte, daha ayrıntılı bilgi Bölüm 8 ve 9'da yer almaktadır.

Genetik kod

mRNA'daki nükleotid dizisi proteindeki amino asit dizisine nasıl çevrilir? Gen ekspresyonunun bu aşamasında, kimyasal olarak birbirleri ile ilgisiz iki makromolekül –nükleik asitler ve proteinler– arasındaki genetik bilgi aktarımı, genlerin davranışını anlamada iki yeni tip problem ortaya çıkartmıştır.

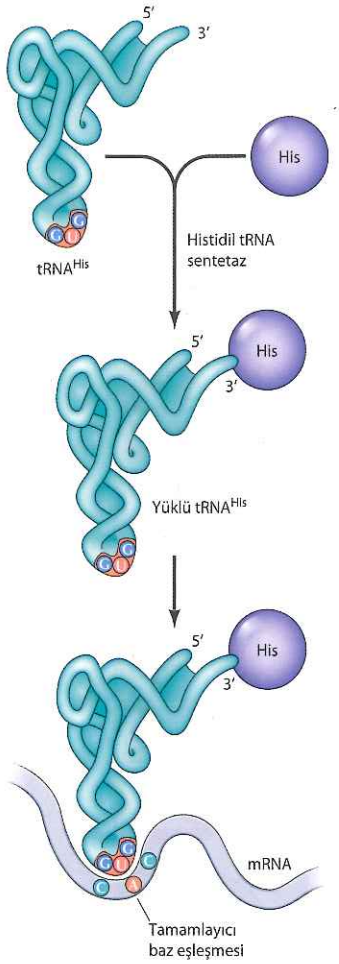
İlk olarak, amino asitler nükleik asitler ile yapısal olarak ilişkisiz oldukları için, amino asitlerin protein yapısına katılmaları sırasında mRNA ve amino asitler arasında doğrudan tamamlayıcı bir eşleşme olması imkansız görünmektedir. O halde protein sentezi sırasında mRNA kalıbına uygun amino asitler nasıl sıralanabilmektedirler? Bu soru, proteine çevrimi sırasında tRNA molekülünün mRNA ve amino asit arasında bir adaptör rolü oynadığının keşfedilmesi ile cevaplanabilmiştir (**Şekil 4.10**). Protein sentezinde kullanılmadan önce, her bir amino asit özgün bir enzim aracılığı ile kendine uygun bir tRNA molekülüne tutunmuş durumdadır. Her tRNA'nın üzerindeki bir tanıma bölgesi ile mRNA üzerindeki bunu tamamlayıcı dizi arasında baz eşleşmeleri olur, böylece bağlı amino asit mRNA kalıbı üzerindeki doğru pozisyonuna yönlendirilir.

İkinci problem ise, nükleotid dizisinin amino asit dizisine çevriminde **genetik kod**'un nasıl belirlendiğidir. Dört farklı nükleotidin diziliminin içerdiği bilgi, proteinlerdeki 20 farklı amino asitin dizilimine nasıl dönüşebilmektedir? Yirmi amino asit sadece dört farklı nükleotid tarafından belirlendiğine göre, her bir amino asitin kodlanması için en az üç nükleotid kullanılmalıdır. Tek bir nükleotidin tek bir amino asit kodladığını varsayarsak dört nükleotid sadece



Şekil 4.9 DNA'dan RNA sentezi DNA'nın iki ipliği çözülür ve ipliklerden birisi tamamlayıcı RNA ipliğinin sentezlenmesi için kalıp olarak kullanılır.

Animasyon 4.3
sites.sinauer.com/cooper7e/a4.3
"Ana Dogma (Central Dogma)"
Moleküler biyolojinin ana dogması ilk olarak Francis Crick tarafından ortaya atıldığı haliyle, bilgi akışının DNA'dan RNA'ya ve RNA'dan proteine olduğunu önermektedir.

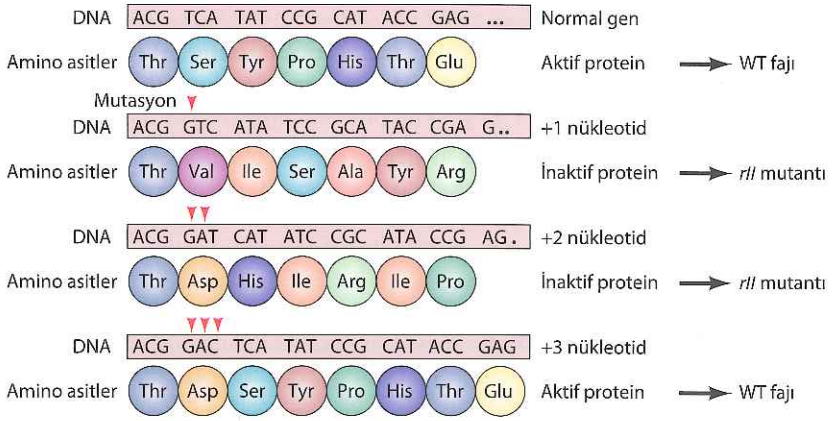


Şekil 4.10 Taşıyıcı RNA'nın fonksiyonu Taşıyıcı RNA, protein sentezi sırasında bir adaptör olarak iş görür. Her bir amino asit (örn., histidin) kendisine özgün bir tRNA'nın 3′ ucuna uygun bir enzim (bir aminoaçil tRNA sentetaz) aracılığı ile bağlanır. Yüklü tRNA'lar daha sonra tamamlayıcı baz eşleşmesiyle bir mRNA kalıbı üzerinde sırayla dizilirler.

dört amino asit, iki nükleotidin bir amino asiti kodladığı varsayıldığında ise, dört nükleotid toplam onaltı (4^2) amino asit kodlayabilir. Üçlü olarak kullanıldığında, dört nükleotid 64 (4^3) farklı amino asit kodlayabilir ve bu sayı proteinlerde bulunan 20 farklı amino asiti kodlamak için rahatlıkla yeterlidir.

Üçlü kod için direkt deneysel kanıtlar, etraflıca çalışılmış olan ve *rII* olarak adlandırılan gende mutasyon içeren T4 bakteriyofajlarıyla çalışılarak elde edildi. Bu gende mutasyonu olan fajlar, kültür ortamında normal fajlardan kolaylıkla ayırt edilebilen oldukça büyük plaklar oluştururlar. Bu yüzden *rII* mutantlarının eldesi ve haritalanması kolaydır ve bu lokusun ayrıntılı genetik haritasının oluşturulması mümkün olmuştur. *rII* mutantları arasında bir ya da iki nükleotidin eklenmesi veya çıkarılması ile oluşturulan rekombinantlardan yapılan çalışmalar, bu mutasyonların her zaman mutant fenotip oluşması ile sonuçlandığını gösterdi. Üç nükleotid eklenmesi ya da kaybı olan fajlar ise, genellikle, normal işlevlerine devam etmekteydi (**Şekil 4.11**). Bu bulgular, genlerin, belirli bir noktadan başlayarak üçlü nükleotid grupları halinde okunduğunu gösterdi. Bu durumda, bir ya da iki nükleotidin eklenmesi ya da çıkarılması genin okuma çerçevesini değiştirecek ve sentezlenen proteinde hatalı amino asitlerin kodlanmasına yol açacaktır. Bunun aksine, üç nükleotidin birarada kaybı ya da fazlalığı ise, tek bir amino asitin eklenmesi ya da eksikliği ile sonlanacak ve bu bölgeden sonraki amino asit dizini değişmeden kalarak, işlevsel bir protein elde edilecektir.

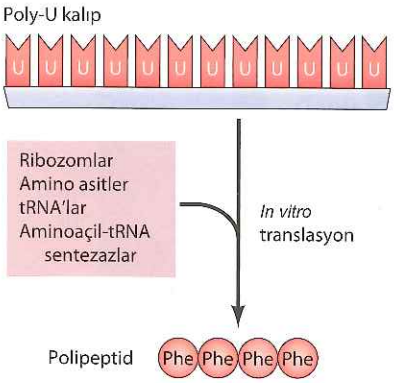
Genetik şifrenin çözülmeye başlaması, hangi nükleik asit üçlülerinin hangi amino asitlere karşılık geldiğine yönelik bir soruyu gündeme getirdi. Bu problemin çözümü için, protein sentezinin hücre dışında gerçekleştirildiği *in vitro* sistemler kullanıldı (***in vitro* translasyon**). Ribozomlar, amino asitler, tRNA'lar ve bu tRNA'lara uygun amino asitlerin bağlanmasını sağlayan enzimler (aminoaçil-tRNA sentetazlar) içeren hücre özütlerinde, amino asitlerin proteinleri oluşturacak şekilde diziliminin katalizlendiği biliniyordu.



Şekil 4.11 Üçlü kodun genetik kanıtları T4 bakteriofajının *rII* geninde, bir, iki ya da üç nükleotid ilavesi şeklinde bir dizi mutasyon çalışılmıştır. Bir ya da iki nükleotid ilavesi, mutasyon sonrasındaki dizinin okuma çerçevesini değiştirir. Bu yüzden, mutasyondan sonraki amino asitlerin tamamı anormaldir ve mutant faj oluşumuna neden olan inaktif bir protein üretilir. Buna karşın, üç nükleotid eklenmesi, sadece tek bir amino asiti değiştirir. Genin geri kalan kısmında okunma çerçevesi normaldir ve yabanıl tip (wild tpe: WT) fajın oluşmasını sağlayan aktif bir protein üretilir.

Ancak, böyle bir sistemde protein sentezi için, ribozoma bağlanmış mRNA'ların olması gerekliydi ve ortama mRNA eklenmesi, protein sentezini yönlendirdiğinden, baz dizileri bilinen sentetik mRNA'lar kullanılarak genetik kodun ortaya çıkarılması mümkün olabilirdi.

Bu konudaki ilk deney Marshall Nirenberg ve Heinrich Matthaei tarafından, sadece urasil içeren sentetik RNA polimerlerinin *in vitro* translasyonu ile gerçekleştirildi (Şekil 4.12). Bu poli-U-kalıbı sadece tek bir amino asiti -fenilalanin- içeren bir polipeptid zinciri oluşumu ile sonlandığı görüldü. Böylelikle üçlü UUU tekrarının fenilalanini kodladığı anlaşılmış oldu. Yalnızca tek nükleotidin kullanıldığı benzer deneylerle, AAA'nın lizin ve CCC'nin de prolini tanımladığı ortaya kondu. Şifrenin kalan kısmının çözülmesi farklı nükleotid karışımlarını içeren RNA polimerleri kullanarak gerçekleştirildi, sonuçta amino asitleri oluşturan 64 olası üçlünün **(kodon)** (Tablo 4.1) tamamının şifresi belirlendi. Bu 64 kodondan, 61 tanesi belli bir amino asite özgünken, kalan üçü (UAA, UAG ve UGA) protein sentezi sonlanma sinyalini oluşturan dur kodonlarıydı. Kod dejenere oluştur, yani birden fazla kodon aynı amino asiti kodlar. Birkaç örnek dışında (Bölüm 12'de tartışıldı) doğadaki tüm canlılar aynı genetik şifreyi kullanırlar ve bu durum doğadaki tüm canlıların aynı ortak atadan evrimleştiği fikrine güçlü bir destek sağlamaktadır.



Şekil 4.12 Üçlü UUU kodonu fenilalanini kodlar Tekrarlayan urasil dizilerini (bir poli-U kalıbı) içeren sentetik bir RNA'nın *in vitro* translasyonu, sadece fenilalanin içeren bir polipeptid senteziyle sonuçlanır.

Tablo 4.1 Genetik Kod

Birinci Pozisyon	İkinci pozisyon				Üçüncü pozisyon
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	dur	dur	A
	Leu	Ser	dur	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Animasyon 4.4

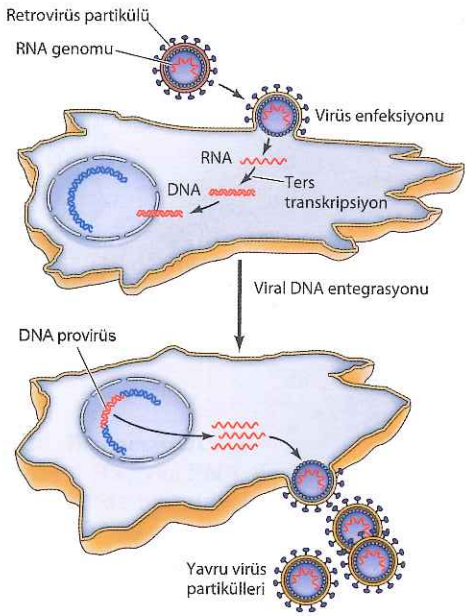
sites.sinauer.com/cooper7e/a4.4
DNA Mutasyonları Bir genin kodlayan bölgesindeki tek baz çiftlik mutasyon, mutasyonun özelliğine bağlı olarak polipeptidin erken sonlanmasına veya amino asit zincirinde hatalı amino asit olan polipeptide neden olabilir.

Animasyon 4.5
sites.sinauer.com/cooper7e/a4.5
HIV Üremesi Konak hücrenin içindeki replikasyon döngüsünün parçası olarak, bir retrovirüs, ters transkriptaz enzimlerini kullanarak kendi RNA genomunu DNA'ya kopyalar.

RNA virüsleri ve revers transkripsiyon

Genetik kodun aydınlatılması, hücre moleküler biyolojisinin temel kurallarının belirlenmesi anlamına geliyordu. Ana dogmaya göre, genetik madde DNA'dır ve kendini eşleyebilme ve daha sonra, protein sentezi sırasında kalıp görevi görecek olan mRNA kalıbını oluşturma yeteneğindedir. Bununla birlikte, Bölüm 1'de de söz edildiği gibi, pek çok virüs genetik materyal olarak DNA yerine RNA içerir, bu durum da genetik bilgi aktarımının farklı tipleri olduğunu düşündürmektedir.

RNA genomu ilk kez, pek çoğu sadece RNA ve proteinden oluşan bitki virüslerinde saptandı. Bu virüslerde RNA'nın genetik madde olduğunun doğrudan kanıtları ise, 1950'lerde tütün mozaik virüsünden elde edilen RNA'nın konakçı hücreyi enfekte edebildiğinin ve enfeksiyon yapabilen yeni virüsler oluşturabildiğinin gösterilmesi ile elde edildi. Viral RNA genomlarının replikasyon tipleri ise *E. coli*'nin RNA bakteriyofajları ile yapılan çalışmalarla belirlendi. Bu virüslerin, DNA replikasyonu veya DNA'dan RNA transkripsiyonu sürecinde kullanılan eşlenik iplikler arasındaki bez eşlemesi mekanizmasını ile, kalıp RNA'dan RNA sentezini (RNA-ile yönlendirilen RNA sentezi) katalizleyebilen sipesifik bir enzim kodladığı bulundu.



Şekil 4.13 Ters transkripsiyon ve retrovirüs replikasyonu Retrovirüsler, viral partiküllerinde RNA genomları içerir. Bir retrovirüs konakçı bir hücreyi enfekte ettiği zaman, ters transkripsiyon mekanizmasını kullanarak viral RNA'nın bir DNA kopyasını sentezler. Bu viral DNA daha sonra konakçının kromozomal DNA'sına bir DNA provirüs olarak katılır ve transkripsiyonla yavru virüs RNA'larını oluşturur.

Poliovirüs ve influenza virüsleri gibi pek çok hayvan virüsünün RNA'dan RNA sentezi yoluyla replike oldukları bulunmuş olsa da, enfekte ettikleri hayvanlarda kanser oluşturma yetenekleri nedeniyle özel ilgi gören bir hayvan virüs ailesinin (RNA tümör virüsleri), kendilerini eşleme aşamasında kullandıkları mekanizma bu değildi. Her ne kadar, bu virüslerin viral partikülleri genomik RNA içeriyor ise de, 1960'larda Howard Temin tarafından yapılan deneyler, bu virüslerin replikasyonu için, enfekte ettikleri hücrede DNA sentezinin gerekli olduğunu göstermiş ve RNA tümör virüslerinin (**retrovirüs** olarak adlandırılan) replikasyon aşamasında DNA provirüs olarak adlandırılan aracı bir DNA molekülüne ihtiyaç duyduğu hipotezinin oluşmasına öncülük etmiştir (**Şekil 4.13**). Bu hipotez, RNA ile yönlendirilen DNA sentezini öngördüğü ve dolayısı ile ana dogmaya aykırı olduğu için, başlangıçta bilim çevrelerince kabul görmemiştir. Fakat 1970'lerde Temin ve David Baltimore, birbirlerinden bağımsız olarak, RNA tümör virüslerinde kalıp RNA'dan DNA sentezini katalizleyen yeni bir enzim keşfettiler. Buna ek olarak, enfekte hücrelerde viral DNA dizilerinin varlığını açıkça gösteren kanıtlar elde edildi. Böylece günümüzde, **ters transkripsiyon** olarak bilinen RNA'dan DNA'nın sentezi, biyolojik sistemlerde bilginin aktarılması için kullanılan yollardan biri olarak kabul edildi.

Ters transkripsiyon sadece retrovirüslerin çoğalmasında önemli olmayıp, aynı zamanda moleküler ve hücre biyolojisine iki önemli açılım getirdi. Bunlardan ilki, ters transkripsiyonun yalnızca retrovirüsler ile sınırlı olmayıp, Bölüm 6 ve 7'de tartışıldığı gibi, sıklıkla, DNA dizilerinin bir kromozom bölgesinden diğerine yer değiştirmesinden de sorumlu olmasıdır. Gerçekten de, insan genomunun dizilenmesi çalışmaları, insan genomik DNA'sının yaklaşık %40'ının ters transkripsiyon mekanizması ile oluştuğunu göstermiştir. İkinci önemli nokta da, RNA-ile yönlendirilen DNA sentezini katalizleyen enzimlerin **(revers transkriptaz)** deneysel amaçlarla, herhangi bir RNA molekülünün DNA kopyalarını oluşturmakta kullanılabilmesidir. Revers transkriptaz enziminin

Anahtar Deney

DNA Provirüs Hipotezi

Nature of the Provirus of Rous Sarcoma

Howard M. Temin McArdle Laboratory, University of Wisconsin, Madison, WI *National Cancer Instutute Monographs*, Volume 17, 1964, pages 557-570

Bağlam

Kansere yol açan virüslerin ilki olarak tanımlananı olan Rous sarkom (RSV) virüsü, kanser moleküler biyolojisi çalışmalarında deneysel sistem olarak özellikle tercih edilen bir virüstür. Howard Temin bu alanda çalışmaya 1958 yılında, lisans üstü öğrenci iken, kültür ortamındaki normal hücrelerin RSV ile enfeksiyon sonrasında kanser hücresine transformasyonunu gösteren ilk ölçüm yöntemlerini geliştirerek başladı. Bu tip kantitatif *in vitro* bir yöntemin varlığı, daha sonraki hücre transformasyonu ve virüs replikasyonu çalışmaları için gerekli olan aracı oluşturdu. Temin, çalışmaya devam ettikçe, RSV replikasyonunun diğer RNA virüslerinden belirgin olarak farklı olduğunu gözlemledi. Bu deneyler Temin'in, enfekte hücrelerde viral RNA'nın enfekte hücrenin DNA'sına kopyalandığını belirten DNA provirüs hipotezini öne sürmesine neden oldu - hipotez evrensel olarak kabul gören ana dogma hipotezine tezat oluşturmaktaydı.

Deneyler

DNA hipotezi pek çok farklı tipte deneysel kanıta dayanmaktaydı. Bunlardan ilki, RSV mutantları kullanılarak yapılan hücre transformasyon çalışmalarının, transforme hücrelerin önemli özelliklerinin virüsün genetik bilgisi ile belirlendiğini göstermesiydi. Bu bilgi, virüs replikasyonu olmasa bile, hücre bölünmesini takiben düzenli olarak yavru hücrelere aktarılmaktaydı. Bu nedenle Temin, enfekte hücrelerde provirüs denilen ve değişmeden kalıtılabilen bir viral genomun var olduğunu öne sürdü.

Metabolik inhibitörlerle yapılan deneyler, provirüsün DNA olduğunu kanıtladı. İlk olarak, kalıp DNA'dan RNA sentezini engelleyen aktinomisin D'nin, RSV ile enfekte hücrelerde virüs üretimini engellediği bulundu (bkz. şekil). İkinci olarak, DNA sentezi inhibitörlerinin RSV ile hücre enfeksiyonunun erken safhalarını durdurduğu görüldü. Böylelikle DNA sentezinin enfeksiyonun başlangıç aşamalarında gerekli olduğu ve yeni virüslerin daha sonraki üretimleri için DNA-ile yönlendirilen RNA sentezine gereksinim duydukları ortaya çıktı, bu da provirüsün viral RNA genomunun kopyası olan bir DNA olduğu fikrinin öne sürülmesine neden oldu. Temin, nükleik asit belirleme yöntemleri kullanarak, enfekte hücrelerin DNA'larında viral DNA'nın varlığını göstererek hipotezi için daha ileri kanıtlar elde etmeyi denedi, ancak o dönemde var olan yöntemlerin duyarlılığının düşük olması nedeniyle elde ettiği veriler güvenilir olmadı.

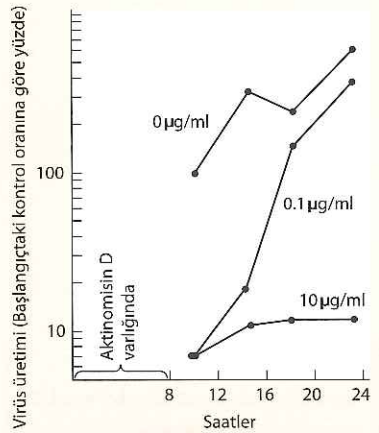
Etki

Bu nedenle, DNA provirüs hipotezi, temel olarak genetik deneyler temelinde ve metabolik inhibitörlerin etkisi olarak sunuldu. Moleküler biyolojideki kabul gören ana dogma hipotezinin karşıtı olduğu için çok iddialı bir öneriydi. Temin'in RNA'dan DNA'ya bilgi aktarımı yolu ile RSV replikasyonu hipotezi bu haliyle bilimsel çevrelerce sadece reddedilmekle kalmadı, aynı zamanda alay konusu oldu. Bununla birlikte, Temin 1960'lara kadar konu üzerinde ısrar etti ve hipotezine daha ikna edici, daha fazla kanıt bulmak için deneylerine devam etti. Bu çabalar, 1970 yılında Temin ve Satoshi Mizutani ve eş zamanlı olarak David Baltimore tarafından, ana dogmanın aksine bir hipotezin var olabileceğinin kesin biyokimyasal kanıtı olarak, RNA kalıbından DNA sentezleyen ve günümüzde revers transkriptaz olarak bilinen bir viral enzimin keşfi ile sonlandı.

Temin 1970'de yazmış olduğu

Howard M. Temin

yayınında bu sonuçları şu cümlelerle açıklamaktaydı: "kanıtlar DNA provirüs hipotezinin doğru olduğuna, RNA tümör virüslerinin, hücrede iken DNA genomuna ve virion halinde iken ise RNA genomuna sahip olduğunun güçlü kanıtı oluşmuştur. Bu sonucun, viral karsinogenez teorileri ve büyük bir olasılıkla diğer biyolojik sistemlerde bilginin aktarımı konularında güçlü etkileri olacaktır". Temin'in öngördüğü gibi, RNA-ile yönlendirilen DNA sentezinin keşfi, kanserin, insan retrovirüslerinin ve gen yeniden düzenlenmelerinin anlaşılmasında belirgin ilerlemelere yol açtı. Daha sonraları, revers transkriptaz enzimi cDNA klonlaması ve dolaylı olarak hücre ve moleküler biyolojinin pek çok alanında önemli ilerlemeler sağlamıştır.



Aktinomisin D'nin RSV çoğalması üzerine etkisi RSV ile enfekte edilmiş olan hücreler Aktinomisin D ile, belirtilen konsantrasyonlarda 8 saat süre ile kültüre edilir. Daha sonra Aktinomisin D ortamdan uzaklaştılır ve üretilen virüs miktarı ölçülür.

Bilgi İçin

Bakterilerin DNA'ları kendi kesim enzimleri tarafından neden kesilmezler? Kesim enzimleri bakterilerde tek başlarına çalışmazlar. Bunun yerine, bakteri DNA'sını modifiye eden enzimlerle birlikte çalışırlar ve böylece bakterinin kendi DNA'sı kendi kesim enzimleri tarafından tanınmaz. Bu kesim modifikasyon sistemi yalnızca modifiye edilmemiş yabancı DNA'nın (örneğin viral DNA) özel bir bakteri türü tarafından eksprese edilen endonükleazlar tarafından kesilmesini garanti altına alır.

kullanımı böylece, ökaryot hücrelerinden elde edilen mRNAların, bir sonraki bölümde tartışılacak olan güncel DNA uygulamalarındaki moleküler yaklaşımlar kullanılarak çalışılmasına olanak tanımıştır.

Rekombinant DNA

Moleküler biyolojideki klasik deneyler, genlerin doğası ve ekspresyonu konularında temel kavramlar geliştirmemizde büyük katkı sağlamıştır. Bu çalışmalar temel olarak genetik analizlere dayandığı için, başarıları büyük oranda, hızlı çoğalan basit yapıdaki organizmaları (bakteri ve virüsler gibi) model olarak kullanmalarına bağlı idi. Buna rağmen pek çok ökaryot genomu (örn., insan genomu) *E. coli* gibi bir organizmadan binlerce kez daha karmaşık yapıda olduğu için, belirlenen temel prensiplerin ökaryot hücrenin karmaşık yapısını anlamada ne kadar başarılı olacağı şüpheli idi. Bu tip karmaşık genomlarla moleküler düzeyde çalışma fikri 1970'lerin başlarında cesaret kırıcıydı. Özellikle genlerin izole edilmesi ve çalışılması imkansız gibi görünmekteydi.

Moleküler biyolojinin ilerlemesi önündeki bu sorun, herhangi bir hücre tipine ait genin izole edilmesine, dizisinin belirlenmesine ve genlerle çalışılabilmesine olanak veren, rekombinant DNA teknolojisinin geliştirilmesi ile aşıldı. Rekombinant DNA uygulamaları, ökaryotik genler ve genomların yapı ve fonksiyonları üzerinde ayrıntılı moleküler çalışmalar yapılmasını ve böylelikle hücre biyolojisini anlamamızda devrim niteliğinde gelişmeler yaşanmasını olanaklı kıldı.

Restriksiyon endonükleazlar

Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesinde ilk aşama, DNA'yı belli dizilerden kesen enzimlerin **-restriksiyon endonükleazların-** tanımlanması oldu. Bunların, bakterilerde, yabancı bir DNA molekülünün (örn., viral DNA) hücreye girişine karşı bir savunma mekanizması sağlayan enzimler olduğu saptandı. Bakterilerin, DNA molekülünü yüzden fazla farklı tanıma bölgesinden kesen, çok sayıda restriksiyon endonükleazı vardır ve her biri, DNA üzerinde dört ila sekiz bazlık (örnekler **Tablo 4.2**'de) özgün dizileri tanır.

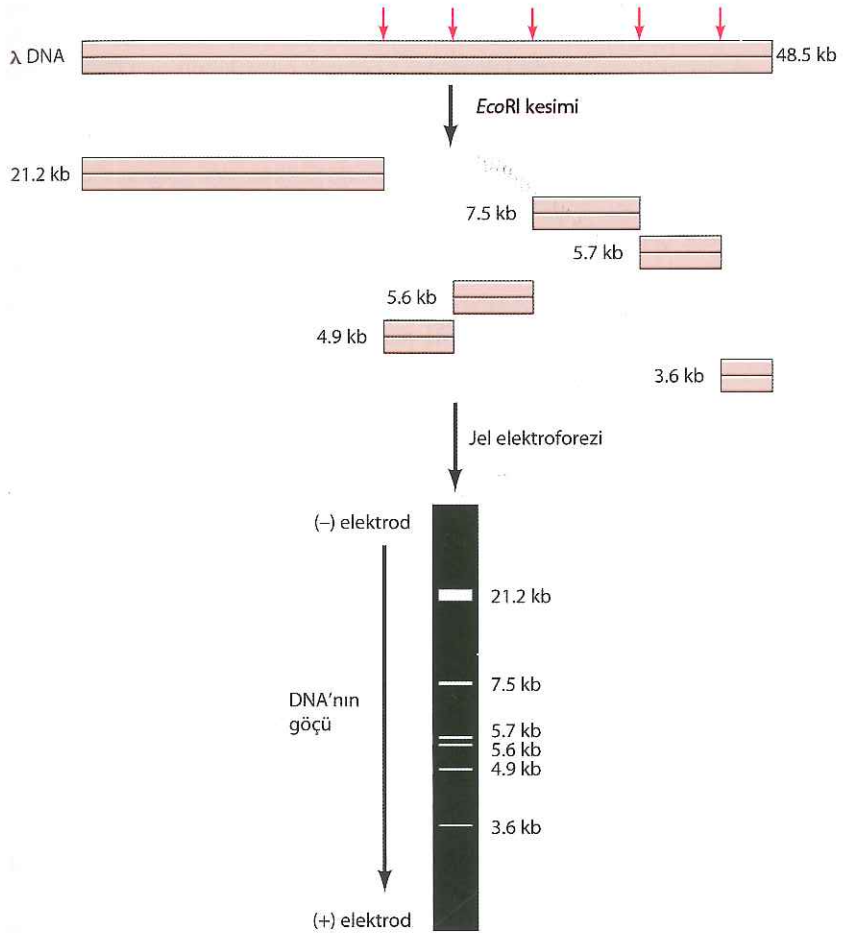
Tablo 4.2 Restriksiyon Enzimlerinin Bazılarına Ait Tanıma Bölgeleri

Enzim[a]	Kaynak	Tanıma bölgesi[b]
*BamH*I	*Bacillus amyloliquefaciens* H	GGATCC
*EcoR*I	*Escherichia coli* RY13	GAATTC
*Hat*III	*Haemophilus aegyptius*	GGCC
*Hind*III	*Haemophilus influenzae* Rd	AAGCTT
*Hpa*I	*Haemophilus parainfluenzae*	GTTAAC
*Hpa*II	*Haemophilus parainfluenzae*	CCGG
*Mbo*I	*Moraxella bovis*	GATC
*Not*I	*Nocardia otitidis-caviarum*	GCGGCCGC
*Sfi*I	*Streptomyces fimbriatus*	GGCCNNNNNGGCC
*Taq*I	*Thermus aquaticus*	GATC

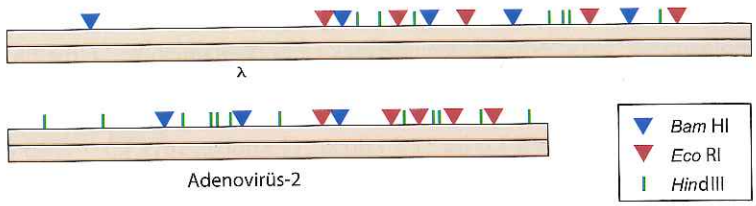
[a] Enzimler izole edildikleri türlere göre iisimlendirilir. Aynı türden izole edilen birden fazla enzim numara ile belirtilir (örn., *Hpa* I ve *Hpa* II gibi).
[b] Tanıma bölgesi sadece çift iplikti DNA'nın tek ipliğindeki diziyi gösterir. "N" aynı bölgede yer alacak herhangi bir bazı temsil etmektedir.

Animasyon 4.6
sites.sinauer.com/cooper7e/a4.6
Restriksiyon Enzimleri Restriksiyon enzimleri DNA'yı özgün bölgelerden keserek sonuçta oluşan DNA parçalarının ucunda yapışkan veya küt uçlar bırakır.

Restriksiyon endonükleazlar DNA'yı özgün dizilerden kestiği için, DNA molekülünü belli bölgelerden kesmek için kullanılabilir. Örneğin, *Eco*RI endonükleazı altı baz çiftinden oluşan GAATTC dizisini tanımaktadır. Bu dizi bakteriyofaj λ DNA'sında beş farklı bölgede bulunur, böylelikle *Eco*RI λ DNA'sını büyüklükleri 3.6 ila 21.2 kilobaz (1 kilobaz veya kb = 1000 baz çifti) arasında altı parçaya ayırır (**Şekil 4.14**). Bu parçalar, moleküllerin elektrik akımı altında göç etme hızlarına göre ayrılmalarını temel alan genel bir yöntem olan **jel elektroforezi** tekniği kullanılarak, büyüklüklerine göre ayrımlanabilirler. Genellikle agaroz ya da poliakrilamidden oluşmuş bir jel, içinde elektrod bulunan iki tampon bölmesi arasına yerleştirilir. Örnek (örn., analiz edilecek olan DNA parçacıkları), jel içinde oluşturulmuş olan kuyucuklara pipet aracılığı ile doldurulur ve jele elektrik akımı verilir. Nükleik asitler (fosfat omurgalarından dolayı) negatif yüklüdür ve pozitif elektroda doğru göç eder. Jel, tıpkı bir elek gibi, daha büyük moleküllerin göçünü geciktirici bir işlev görür. Daha küçük



Şekil 4.14 λ DNA'sının *Eco*RI enzimi ile kesimi ve jel elektroforezi *Eco*RI, λ DNA'sını beş bölgeden (kırmızı oklar) keserek DNA 'nın toplam altı parçaya ayrılmasına neden olur. Bu parçalar agaroz jel elektroforezinde yürütülerek birbirlerinden ayrılır. DNA parçaları pozitif elektroda doğru göç ederler, küçük parçalar jel boyunca diğerlerine oranla daha hızlı hareket eder. Elektroforez işleminden sonra, DNA bir floresan boya ile boyanıp fotoğraflanır. DNA parçalarının büyüklüğü jel fotoğrafı üzerinde gösterilmiştir.



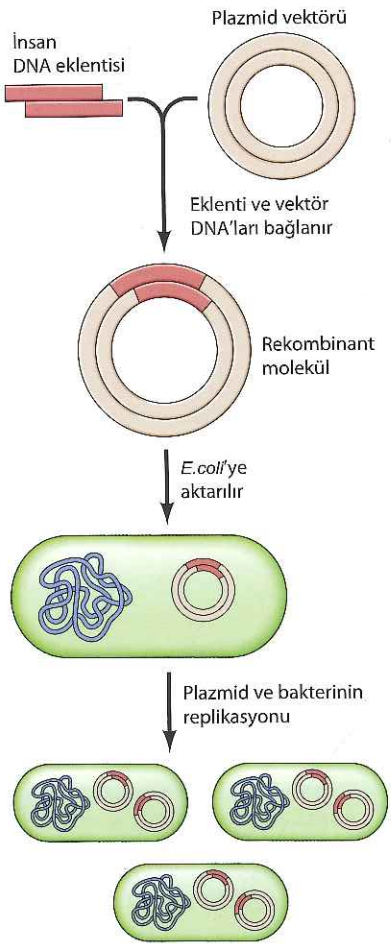
Şekil 4.15 λ ve adenovirüs DNA'larının kesim bölgesi haritaları *E. coli* bakteriyofajı λ (48.5 kb) ve insan adenovirüs-2 (35.9 kb) DNA'larının *Bam*HI, *Eco*RI ve *Hind*III enzimleri için kesim bölgeleri.

Animasyon 4.7
sites.sinauer.com/cooper7e/a4.7
Rekombinant DNA Molekülleri
Moleküler klonlamada temel strateji, ilgilenilen bir DNA parçasının, konak hücre içinde bağımsız olarak replike olabilen bir DNA molekülünün (vektör olarak adlandırılır) içine yerleştirilmesidir.

moleküller daha hızlı hareket ederek, nükleik asit karışımından oluşan DNA parçacıkları büyüklüklerine göre birbirlerinden ayrılır.

Büyüklük farkının yanısıra, kesime uğramış parçacıkların sırası, örneğin λ DNA *Eco*RI kesim bölgelerinin haritası, farklı yollarla da belirlenir. Çok sayıda farklı restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak, viral genom gibi DNA'ların detaylı **kesim bölgesi haritaları** çıkarılabilir (Şekil 4.15). Buna ek olarak, restriksiyon enzimleri ile kesilme sonrası elde edilen her bir DNA parçası jel elektroforezi sonrasında jelden kesilerek çıkarılabilir ve DNA'larının dizilenmesi gibi daha ileri çalışmalarda kullanılabilir. Pek çok virüs DNA'sı bu yaklaşım kullanılarak tanımlanmıştır.

Bununla birlikte restriksiyon endonükleaz kesimi, tek başına, hücresel genom gibi büyük DNA moleküllerinin analizi için yeterli ayırım gücü sağlamaz. Altı baz çiftlik tanıma bölgesi olan bir kesim enzimi (*Eco*RI gibi) istatistiksel olarak DNA'yı her 4096 baz çiftinde bir ($1/4^6$) keser. Bu hesaba göre 48.5 kb büyüklüğünde olan bir λ DNA'sının, Şekil 4.14'de şematize edilen sonuçlarla uyumlu olarak, toplam on adet *Eco*RI parçacığı oluşturması beklenir. Ancak daha büyük genomların bu tip enzimlerle kesimleri oldukça farklı sonuçlar vermektedir. Örneğin, insan genomu yaklaşık olarak $3x10^6$ kb uzunluğunda olduğu için 500,000 den fazla *Eco*RI fragmanı oluşması beklenir. Bu kadar büyük sayıda DNA parçası ayrımlanamaz, böylece insan genomunun *Eco*RI kesiminden sonraki agaroz jel elektroforezi görüntüsünde birbirinden ayrı bantlar yerine, devamlı bir süründü görüntüsü ortaya çıkar. Böyle bir kesimden tek bir fragmanı izole etmek imkansız olduğu için, restriksiyon endonükleaz kesimi, tek başına, daha ileri analizlerde kullanılmak üzere homojen DNA fragmanları elde etmek için uygun değildir. Bu amaçla saflaştırılmış DNA parçalarının eldesi moleküler klonlama yoluyla sağlanabilir.

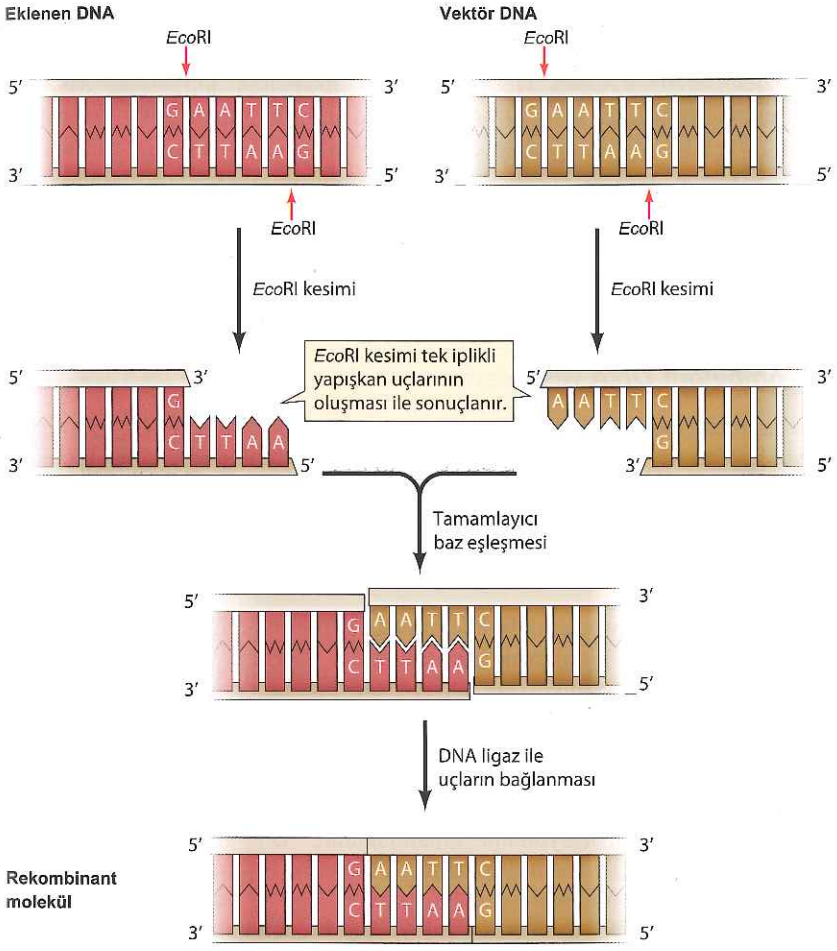


Rekombinant DNA Moleküllerinin Oluşturulması

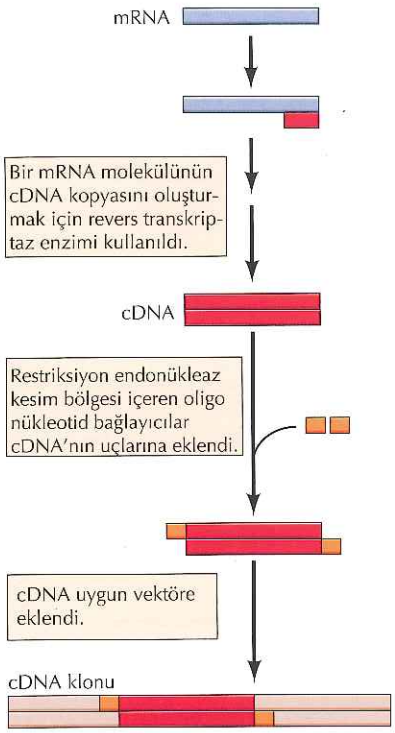
Moleküler klonlama tekniğinin esası, klonlanmak istenilen DNA parçacığının (örn., bir insan DNA parçası) konakçı hücrede bağımsız olarak çoğalabilme kapasitesine sahip bir DNA molekülüne (**vektör** denir) eklenmesi işlemidir. Vektör DNA dizisine bağlı DNA eklentisi ile oluşan moleküle **rekombinant molekül** ya da **moleküler klon** adı verilir. Rekombinant molekülün replikasyonuna izin verecek uygun bir konakçı bulunduğu takdirde, DNA eklentisinin yüksek miktarda elde edilmesi sağlanabilir. Örneğin, insan DNA parçacıkları

Şekil 4.16 Rekombinant bir DNA molekülünün oluşturulması İnsan DNA'sının bir parçası plazmid DNA vektörü içine yerleştirilir. Oluşturulan bu rekombinant molekül daha sonra, kendisi çoğalırken insan DNA parçasını içeren rekombinant plazmidin de replike olacağı *E. coli* içine aktarılır.

plazmid vektörlerine klonlanabilir (Şekil 4.16). **Plazmidler**, bakterilerde kromozomal DNA'dan bağımsız olarak replike olabilen, küçük, çembersel DNA molekülleridir. Bu rekombinant moleküller *E.coli* içine aktarılabilir ve burada insan DNA eklentisini içeren milyonlarca plazmid DNA kopyası oluşturmak için bakteri ile birlikte replike olur. Bu plazmid DNA'larının izole edilmesi ile, insan DNA'sının tek bir parçasını içeren rekombinant moleküller yüksek miktarlarda elde edilebilir. Bir kilobaz uzunluğundaki tipik bir DNA parçası insan genomik DNA'sının milyonda birden az bir kısmını temsil ederken, klonladığı plazmidin yaklaşık beşte birlik bir kısmını temsil eder. Ayrıca, eklenti parçalar, geri kalan vektör DNA'sından endonükleaz kesimi ve jel elektroforezi ile kolayca ayrıştırılarak daha sonraki analiz ve ileri çalışmalar için uygun saflıkta insan DNA parçası elde edilmiş olur.



Şekil 4.17 DNA moleküllerinin bağlanması Vektör ve eklenecek olan DNA'lar, tek iplikli yapışkan uçlar oluşturacak şekilde, bir restriksiyon enzimi ile (*Eco*RI gibi) kesilir. Vektör ve eklenecek olan DNA parçası daha sonra tamamlayıcı baz eşleşmesiyle birleşir. DNA ipliklerinin DNA ligaz enzimiyle kovalent bağlanması ile bir rekombinant molekül oluşturulur.



Şekil 4.18 cDNA klonlaması

Rekombinant molekülleri oluşturmak için kullanılan DNA parçacıkları, genellikle restriksiyon endonükleaz kesimi yolu ile elde edilir. Bu enzimlerin pek çoğu, enzim tanıma bölgelerinde kendilerine karşılık gelen bazlarla eşleşmeye açık, tek iplikli yapışkan uçlar bırakacak şekilde kesim yapar (**Şekil 4.17**). Birbirinin eşleniği olan uçların arasındaki bağlantı, DNA ipliklerindeki kırıkları yapıştıran bir enzim olan **DNA ligaz** ile, kalıcı olarak kurulur (bkz. Bölüm 7). Böylelikle iki farklı DNA parçası (örn., insan DNA parçası ve bir plazmid vektör DNA'sı) aynı kesim enzimi ile kesilerek hazırlandığında, rekombinant DNA molekülünü oluşturacak bağlantıyı yapmaya da hazır hale gelmiştir.

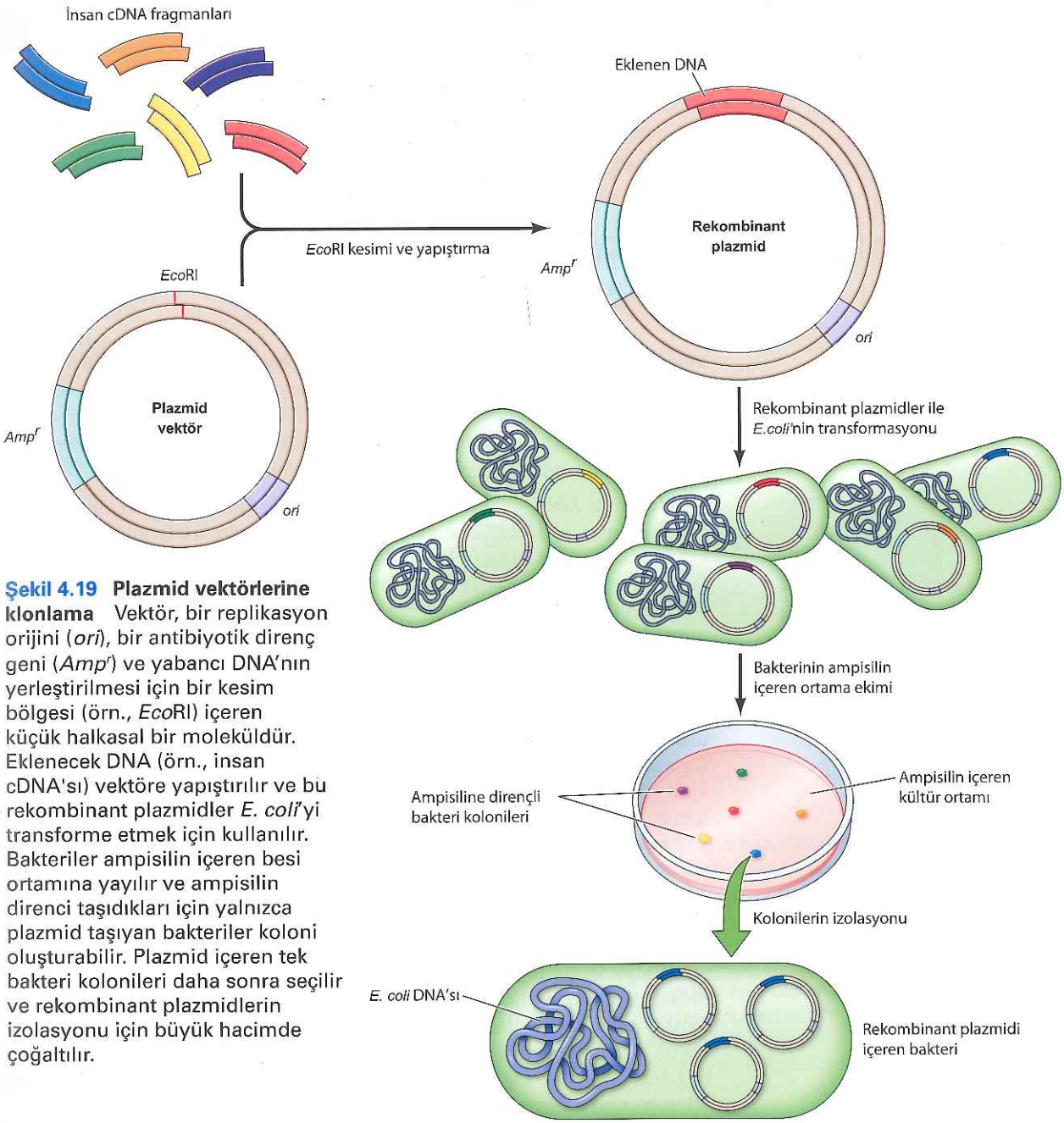
Klonlamada kullanılabilen DNA parçaları, sadece restriksiyon enzimi kesim bölgeleri ile sonlananlarla sınırlı değildir. Farklı restriksiyon endonükleaz enzim kesim bölgeleri içeren sentetik DNA bağlayıcıları "linkers", herhangi bir DNA parçasının küt ucuna eklenebilir. Bağlayıcılar kimyasal sentez yoluyla kolayca elde edilebilen kısa oligonükleotidlerdir ve herhangi bir DNA parçasının bir vektöre bağlanmasını sağlamak için hazırlanmışlardır.

Yalnızca DNA değil, RNA dizileri de klonlanabilir (**Şekil 4.18**). Bu işlemde ilk aşama revers transkriptaz enzimini kullanarak RNA'dan DNA sentezlenmesidir. Oluşan DNA ürünü (kalıp olarak kullanılan RNA'nın tamamlayıcısı olduğu için **cDNA** olarak adlandırılır) daha sonra, anlatıldığı şekilde vektör DNA'sına bağlanır. Ökaryotik genler sıklıkla mRNA'dan kesip-eklenme mekanizması ile uzaklaştırılan kodlamayan diziler (veya introlar) tarafından kesildiği için (kaz. Bölüm 6) gen yapı ve fonksiyonunun anlaşılmasında cDNA'nın genomik DNA ile birlikte klonlanması büyük önem taşımaktadır. Buna ek olarak, cDNA klonlama bir gene karşılık gelen mRNA'nın moleküler bir klon olarak elde edilmesine imkan vermektedir.

Rekombinant DNA vektörleri

Rekombinant moleküllerin oluşturulabilmesi için, klonlanacak DNA eklentisinin büyüklüğüne ve deneyin amacına bağlı olarak birçok farklı tipte klonlama vektörleri kullanılabilir. DNA'nın izolasyonu ve çoğaltılmasına yönelik temel vektör sistemleri bu kısımda anlatılmıştır. Klonlanmış DNA'nın ekspresyonu ve rekombinant molekülün ökaryot hücresine aktarımı için geliştirilen diğer vektörler daha sonraki kısımlarda anlatılacaktır.

Plazmidler yaygın olarak birkaç bin baz çifti büyüklüğünde genomik veya cDNA eklentilerini klonlamak için kullanılır. Plazmid vektörleri genellikle konak hücre DNA polimerazına, DNA molekülünün replikasyonu için sinyal gönderen **replikasyon orijini** bulunduran 2-4 kb'lık DNA'dan oluşur. Buna ek olarak, plazmid vektörleri, plazmid taşıyan bakterilerin seçilebilmesine imkan tanıyan antibiyotik direnç genleri (örneğin, ampisilin direnci) taşımaktadır. Örnek vermek gerekirse, **Şekil 4.19** bir plazmid vektörde bulunan insan cDNA klonunun izolasyonunu anlatmaktadır. Bir grup cDNA parçası, restriksiyon enzimi ile kesilmiş plazmid DNA'sı ile birbirine bağlanır. Oluşan rekombinant DNA molekülleri daha sonra *E. coli*'yi transforme etmek için kullanılır. Plazmid DNA'sı içeren antibiyotiğe dirençli koloniler seçilir. Her bir rekombinant plazmid tek bir antibiyotik dirençli koloni ürettiği için, herhangi bir kolonideki bakteri, özgün bir cDNA eklentisini içerecektir. Böylece plazmid içeren bakteri büyük miktarlarda çoğaltılabilir ve DNA'sı ayrıştırılabilir. Hücre başına sıklıkla yüzlerce kopya olarak bulunan küçük çembersel DNA molekülü, bakteri kromozom DNA'sından ayrıştırılabilir. Sonuçta, klonlanan eklentinin analizi için uygun olan saflaştırılmış plazmid DNA'sı elde edilir.



Şekil 4.19 Plazmid vektörlerine klonlama Vektör, bir replikasyon orijini (*ori*), bir antibiyotik direnç geni (*Amp*^{r}) ve yabancı DNA'nın yerleştirilmesi için bir kesim bölgesi (örn., *Eco*RI) içeren küçük halkasal bir moleküldür. Eklenecek DNA (örn., insan cDNA'sı) vektöre yapıştırılır ve bu rekombinant plazmidler *E. coli*'yi transforme etmek için kullanılır. Bakteriler ampisilin içeren besi ortamına yayılır ve ampisilin direnci taşıdıkları için yalnızca plazmid taşıyan bakteriler koloni oluşturabilir. Plazmid içeren tek bakteri kolonileri daha sonra seçilir ve rekombinant plazmidlerin izolasyonu için büyük hacimde çoğaltılır.

Bakteriyofaj λ vektörleri, ökaryotik hücrelerden hem genomik, hem de cDNA klonlarının izolasyonu için sıklıkla kullanılan vektörlerdir ve plazmidlerden daha büyük DNA eklentilerine uyum sağlamaktadır. Lamda klonlama vektörlerinde virüs çoğalması için gerekli olmayan bölgeler çıkartılarak yerine klonlanacak DNA'nın bağlanmasını sağlayacak özgün enzim kesim bölgeleri eklenir. Bu rekombinant moleküller *E. coli*'ye yerleştirilebilir ve burada mil-

Tablo 4.3 Büyük DNA Parçalarının Klonlandığı Vektörler

Vektör	DNA eklentisi (kb)	Konakçı hücre
Kozmidler	30-45	*E. coli*
P1 Bakteriyofajı	70-100	*E. coli*
P1 yapay kromozomları (PAC'ler)	130-150	*E. coli*
Bakteri yapay kromozomları (BAC'ler)	120-300	*E. coli*
Maya yapay kromozomları (YAC'ler)	250-400	Maya

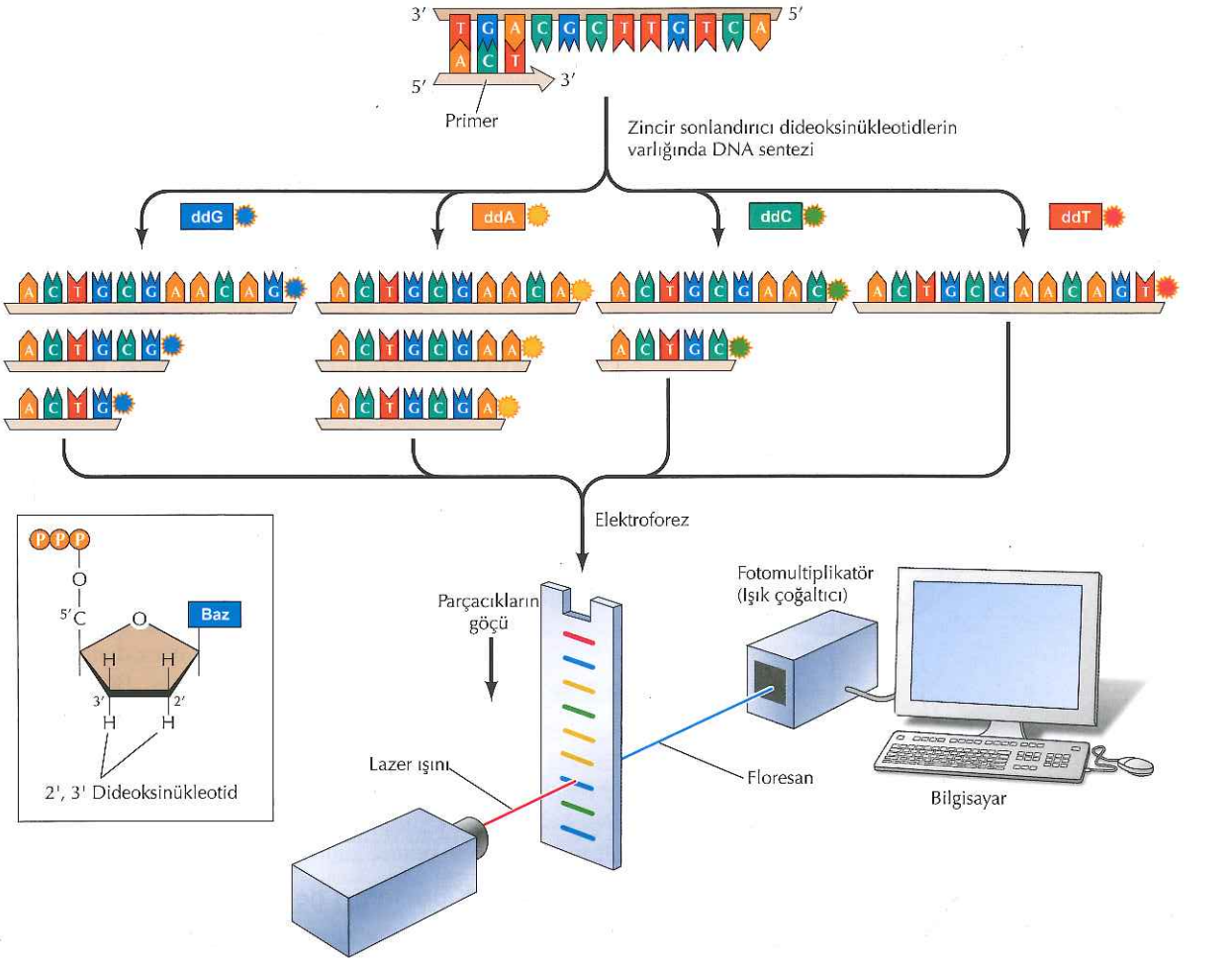
yonlarca tek kopya DNA eklentisi içeren yavru faj üretecek şekilde replike olurlar. Bu fajların DNA'ları daha sonra izole edilebilirler ve klonlanan DNA fragmanının tek bir kopyasını içeren büyük müktarlarda rekombinant molekül elde edilir. DNA eklentisi yaklaşık 15 kb kadar büyük olabilir ve oluşan bu rekombinant genom bakteriyofaj λ partikülünün içine paketlenebilir.

Genomik DNA analizi ile yapılan pek çok çalışmada, plazmid veya λ vektörlerinin alabileceğinden çok daha büyük DNA parçacıklarının klonlanması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan beş ana tip vektör vardır (**Tablo 4.3**). **Kozmid** vektörler yaklaşık 30-45 kb büyüklüğünde parçacıkları taşıyabilirler. Bu vektörler, klonlanan DNA'nın, faj partikülleri içine daha etkin olarak paketlenmesini sağlayacak olan bakteriyofaj λ dizileri bulundururlar. Buna ek olarak, kozmidler, replikasyon orjini ve plazmidlerde bulunan antibiyotik direnç genlerini de bulundurdukları için, bakteri hücresi içinde plazmid olarak çoğalabilirler. Lamda bakteriyofajı yerine, P1 bakteriyofajından geliştirilmiş olan iki adet vektör daha tanımlanmıştır. 70-100 kb DNA parçalarını taşıma kapasitesinde olan P1 bakteriyofaj vektörleri, rekombinant molekülün *in vitro* koşullarda P1 faj partikülü içine paketlenmesine ve daha sonra *E. coli* içinde plazmid olarak replikasyonuna olanak tanıyan dizileri bulundurur. **P1 yapay kromozomu (PAC)** vektörleri de P1 bakteriyofaj dizinleri bulundurlar, ancak, *E. coli* içine doğrudan plazmid olarak girebilmesi olanaklıdır ve 130-150 kb büyüklüğe kadar DNA parçacıklarını taşıyabilirler. **Bakteri yapay kromozomu (BAC)** vektörleri, *E. coli*'nin doğal plazmidinden (F faktör olarak adlandırılır) köken almıştır. Replikasyon orijini ve diğer F faktör dizileri 120-300 kb'ye kadar parçalar taşıyan BAC'ların kararlı şekilde replikasyonuna olanak tanır. Daha büyük parçalar (250-400 kb), **maya yapay kromozom (YAC)** vektörleri kullanılarak klonlanabilir. Bu vektörler, maya replikasyon orijini ve maya hücresi içindeki kromozomlarda olduğu gibi doğrusal şekilde çoğalmaya olanak sağlayan diğer dizileri (Bölüm 6'da tartışılan sentromer, telomer gibi) bulundurur.

DNA dizi analizi

Moleküler klonlama, her bir DNA parçasının, nükleotid dizilerinin belirlenmesini de içeren, ayrıntılı incelenmelerine imkan sağlayacak miktarlarda eldesini olanaklı kılmıştır. Gerçekten de pek çok genin nükleotid dizisinin belirlenmesi, sadece bu genlerin kodladıkları proteinlerin yapısının anlaşılmasını değil, aynı zamanda gen ekspresyonlarını düzenleyen dizilerin özelliklerinin de anlaşılmasını sağlamıştır. Bunun da ötesinde, yeni bulunan genlerin kodlayan dizileri genellikle, daha önce çalışılmış olan genlerle ilişkilidir ve böylelikle yeni izole edilen genlerin fonksiyonları, bu tip dizilim benzerlikleri kullanılarak, doğru olarak tahmin edilebilmektedir.

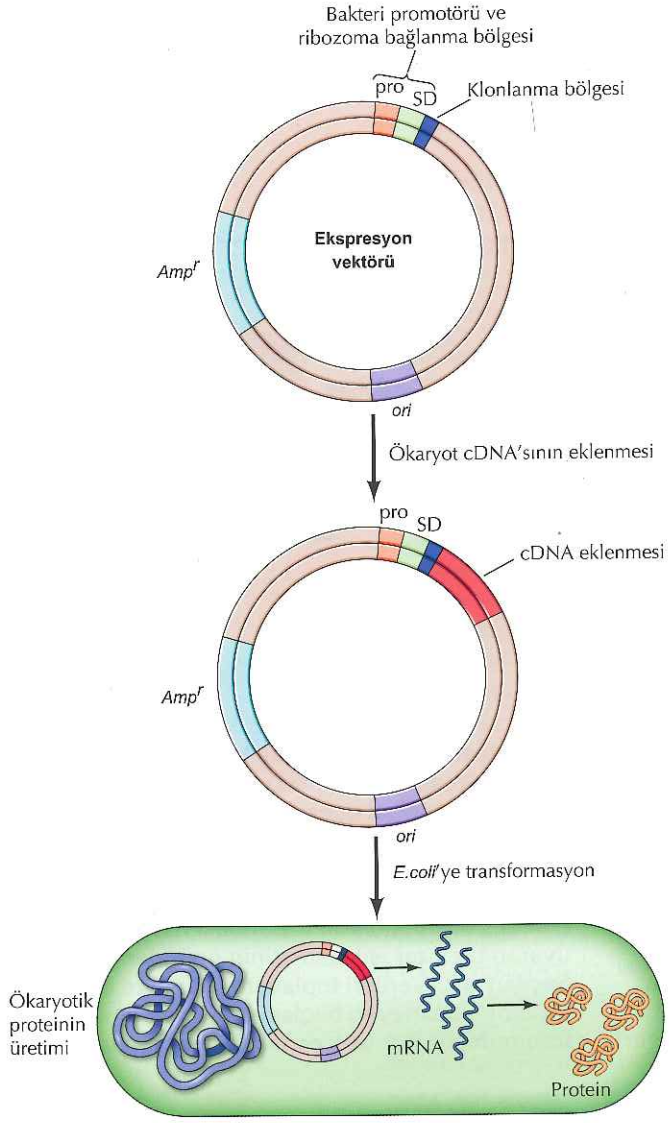
Animasyon 4.8
sites.sinauer.com/cooper7e/a4.8
Bir DNA İpliğini Dizileme DNA dizileme yöntemlerinden biri, otomatik saptama sistemleri tarafından belirlenebilen zincir sonlandıran floresan nükleotidleri kullanan modifiye bir DNA sentez reaksiyonu içermektedir.



Şekil 4.20 DNA dizi analizi Dideoksinükleotidler, 2′ ve 3′ konumunda –OH grubu bulunmayan deoksiriboz'lardır. DNA sentezini özgün bazlarda sonlandırmak için kullanılırlar. Bu moleküller, normal olarak uzayan DNA zincirine katılır. Dideoksinükleotidler 3′-OH gruplarından yoksun oldukları için, zincire bir sonraki nükleotid ilave edilemez ve dolayısıyla DNA ipliğinin sentezi sonlanır. Reaksiyon, normal dört deoksinükleotidle birlikte, her biri farklı floresan boya ile işaretli dört farklı dideoksinükleotid içerir. Dideoksinükleotidlerin sentezlenen zincire katılımı ile DNA sentezi durur. Böylece, reaksiyon sonucunda primerden itibaren uzayan ve normal deoksinükleotidin yerine floresan etiketli dideoksinükleotid gelen bir seri ürün oluşur. Bu ürünler, daha sonra jel elektroforezi ile ayrıştırılır. DNA zincirleri jel içerisinde göç ederken, dideoksinükleotidlerin üzerindeki floresan boyaları uyaran bir lazer ışık demetinin önünden geçerler. Saçılan ışık, verileri toplayan ve analize ederek DNA dizilimini belirleyen bilgisayarın bağlı olduğu bir fotomultiplikatör (ışık çoğaltıcı) tarafından saptanır.

DNA'nın dizilenmesi için kullanılan temel yöntem Frederick Sanger tarafından 1977'de geliştirildi ve DNA sentezinin, zinciri sonlandırıcı **dideoksinükleotidlerin** (3' hidroksil grubu olmayan deoksiriboz) eklenmesi ile erken sonlanması prensibine göre çalışır (Şekil 4.20). DNA sentezi, klonlanan DNA'nın üzerindeki özgün bir bölgede sentetik primerden başlatılır. DNA sentez reaksiyonu, normal eşleniklerine ek olarak dört dideoksinükleotidin (A, C, G ve T) her birini içerir. Bu dört dideoksinükleotidin her biri farklı bir floresan boya

ile işaretlenir ve böylece DNA'ya girişleri izlenebilir. Bir sonraki nükleotidin bağlanacağı 3' hidrokisil grubunun olmamasından dolayı dideoksinükleotidin katılımı DNA sentezinin daha fazla ilerlemesini durdurur. Böylece, her biri sipesifik bir floresan dideoksinükleotid ile temsil edilen baz ile sonlanan bir seri işareli DNA molekülü üretilir. Bu DNA parçacıkları daha sonra boyutlarına göre jel elektroforezi ile ayrıştırılır. Yeni sentezlenen DNA iplikçikleri jelde elektroforez edilirken, floresan etiketleri uyaran bir lazer demetinin önünden geçerler. Sonuçta, etrafa saçılan ışık bir fotomultiplikatör tarafından algılanır ve bilgisayarda toplanan bu veri analiz edilir. Her bir parçacığın boyutu, özgün bir renge sahip floresan ile işaretlenmiş terminaldeki dideoksinükleotid sayesinde belirlenir. Böylelikle, floresan işaretli DNA parçacıkları jel içinde göç ederken DNA dizilimi sıra ile okunur.



Şekil 4.21 Klonlanmış genlerin bakteride ekspresyonu Ekspresyon vektörleri, bakteri içine yerleştirilen DNA parçasının transkripsiyonunu yönlendiren promotor dizileri (pro) ve mRNA'nın bakteriyel ribozomlara bağlanması için gerekli dizileri (Shine-Dalgarno [SD] dizileri, Bölüm 9'da anlatıldı) içerir. Bu dizilere, komşu olarak yerleştirilen ökaryotik bir cDNA'nın ekspresyonu *E. coli*'de etkin bir biçimde sağlanabilir. Sonuçta, transforme bakteride ökaryotik proteinlerinin üretimi sağlanmış olur.

Dideoksinükleotidleri kullanan yüksek çıktılı otomatize DNA dizileme, insan genomu gibi, tam genomların dizilimini belirlemek için gerekli büyük ölçek analizleri mümkün kılmaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda DNA'yı daha hızlı ve daha ucuz dizileyebilen yeni metodlar geliştirilmiştir. Bölüm 5'de tartışıldığı gibi, bu yeni yaklaşımlar, özellikleri dikkate alınarak **yeni nesil dizileme** olarak anılmaktadır ve belirlenen çok sayda bireyin genomunun kolaylıkla dizilenebilmesine imkan vermektedir.

Klonlanmış genlerin ekspresyonu

Moleküler klonlama, genlerin nükleotid dizilerinin -dolayısıyla kodladıkları proteinlerin amino asit dizilerinin- saptanması olanağına ek olarak, işlevsel ve yapısal tanımlanma çalışmalarında kullanılmak üzere, bol miktarda protein elde edilmesini de olanaklı kılmıştır. Pek çok protein, ökaryot hücrelerde çok düşük seviyelerde bulunduğu için, bilinen biyokimyasal yöntemlerle yeterli miktarlarda izole edilemezler. Bu problem, geni klonlanmış bir proteinin, hem bakteri hem de ökaryot hücrelerde yüksek seviyede gen ekspresyonuna olanak veren vektörlerin kullanımı ile çözülebilmiştir.

Bir ökaryot geninin *E. coli*'de ekspresyonunun sağlanması için, ilgili genin cDNA'sı, eklenen genin transkripsiyon ve proteine translasyonunu yönlendirecek diziler içeren, bir plazmid veya faj vektörüne klonlanır (**ekspresyon vektörü**) (Şekil 4.21). Klonlanan genin ekspresyonu ile oluşan ürün, toplam bakteri proteinlerinin %10'una karşılık gelecek kadar yüksek olabilir. Bu durumda, klonlan-

mış gen tarafından kodlanan proteini, ayrıntılı biyokimyasal ve yapısal çalışmalarda kullanmaya yetecek oranda saflaştırmak daha sıradan bir işlemdir.

Klonlanmış bir genin yüksek düzeyde protein eksprese etmesi için, ökaryot hücreler bakteri hücresinden daha sıklıkla yararlanılan bir modeldir. Bu tip ekspresyon, örneğin proteinin translasyon sonrası normalde yapılan modifikasyonlarının (karbohidrat ve lipidlerin eklenmesi gibi) yapıldığından emin olmak açısından önemli olabilir. Ökaryot hücrelerde bu gibi protein ekspresyonları, klonlanmış genin yüksek seviyede gen ekspresyonunu yönlendirecek bir vektörün (genellikle bir virüsten türeyen) içine yerleştirilmesi ile, *E. coli*'deki gibi başarıyla gerçekleştirilebilir.

Nükleik Asitlerin ve Proteinlerin Saptanması

Moleküler klonlamanın gelişi, ökaryotik hücrelerdeki bireysel genlerin izolasyonunu ve karakterizasyonunu mümkün kılmıştır. Genlerin hücre içindeki rollerinin anlaşılması, her bir genin ve bunların kodladıkları proteinlerin hücre içindeki organizasyon ve ekspresyonlarının analizini gerektirmektedir. Bu bölümde, belirli nükleik asit ve proteinlerin saptanması için kullanılan temel yöntemler tartışılacaktır. Bu yaklaşımlar, gen ekspresyonunun analizi ve proteinlerin hücre içi örganellere yerleşimleri gibi geniş kapsamlı çalışmalar için önemlidir.

DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu

Moleküler klonlama, DNA parçacıklarının bakteride çoğaltılmasına ve büyük miktarlarda izole edilmelerine olanak vermektedir. Tek bir DNA molekülünün büyük miktarlarda elde edilmesi için kullanılan alternatif bir yöntem de, 1988'de Kary Mullis tarafından geliştirilen **polimeraz zincir reaksiyonudur (PCR)**. PCR, dizisi bilinen DNA moleküllerinin, tamamen *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen reaksiyonlar ile büyük miktarlarda amplifikasyonunu sağlamaktadır. Esasen, DNA'nın tanımlanan bir bölgesinin tekrarlayan amplikasyonu için DNA polimeraz kullanılır. DNA'nın her bir replikasyon döngüsünde iki katına çıkması ile DNA moleküllerinin sayısı katlanarak artar, böylece başlangıçtaki az miktarda kalıp DNA'dan yeterli miktarda DNA elde edilmesi sağlanır. Örneğin, 30 döngü boyunca amplifiye edilen tek bir DNA molekülünden, teorik olarak 2^{30} adet (yaklaşık 1 milyar) yeni molekül elde edilecektir. Böylece, tek bir DNA molekülünün amplifikasyonu ile moleküler klonlama veya nüldetotid dizi analizi gibi daha ileri analizler için gereken miktarlarda DNA elde edilebilir.

DNA'nın PCR amplifikasyonunun genel basamakları **Şekil 4.22**'de şematize edilmiştir. Başlangıç materyali, klonlanmış bir DNA parçacığı ya da bir DNA karışımı-örneğin insan hücrelerinden elde edilen toplam DNA olabilir. Bu karışımdaki DNA'nın özgün bir bölgesi amplifiye edilebilir, bunun için bu bölgeyi çevreleyen nükleotid dizinlerinin bilinmesi ve amplifikasyon işlemini başlatacak olan primerlerin bu dizilere özgün olması gerekmektedir. Primerler, genellikle kimyasal olarak sentezlenen, 15-20 bazlık DNA oligonüklotid dizileridir. DNA sentezinin başlatılması için, eşlenik DNA ipliklerinin zıt yönlerinden iki adet primer kullanılır. Reaksiyona kalıp DNA'nın iki ipliğini ayırmak için yüksek sıcaklığa (örn., 95°C) çıkılarak başlanır. Sıcaklık daha sonra, primerlerin kalıp üzerinde kendilerine karşılık gelen diziler ile eşleşmeleri için düşürülür. DNA polimeraz, her iki iplikte de kalıba tamamlayıcı yeni bir iplik sentezlemek için primerleri kullanır. Bu yüzden, işlemin bir amplifikasyon döngüsünde, bir kalıp molekülden iki yeni DNA molekülü sentezlenir. Her replikasyon döngüsünde DNA molekülünün iki kat artışı ile sonuçlanan bu işlem, pek çok kez tekrarlanabilir.

Bilgi İçin

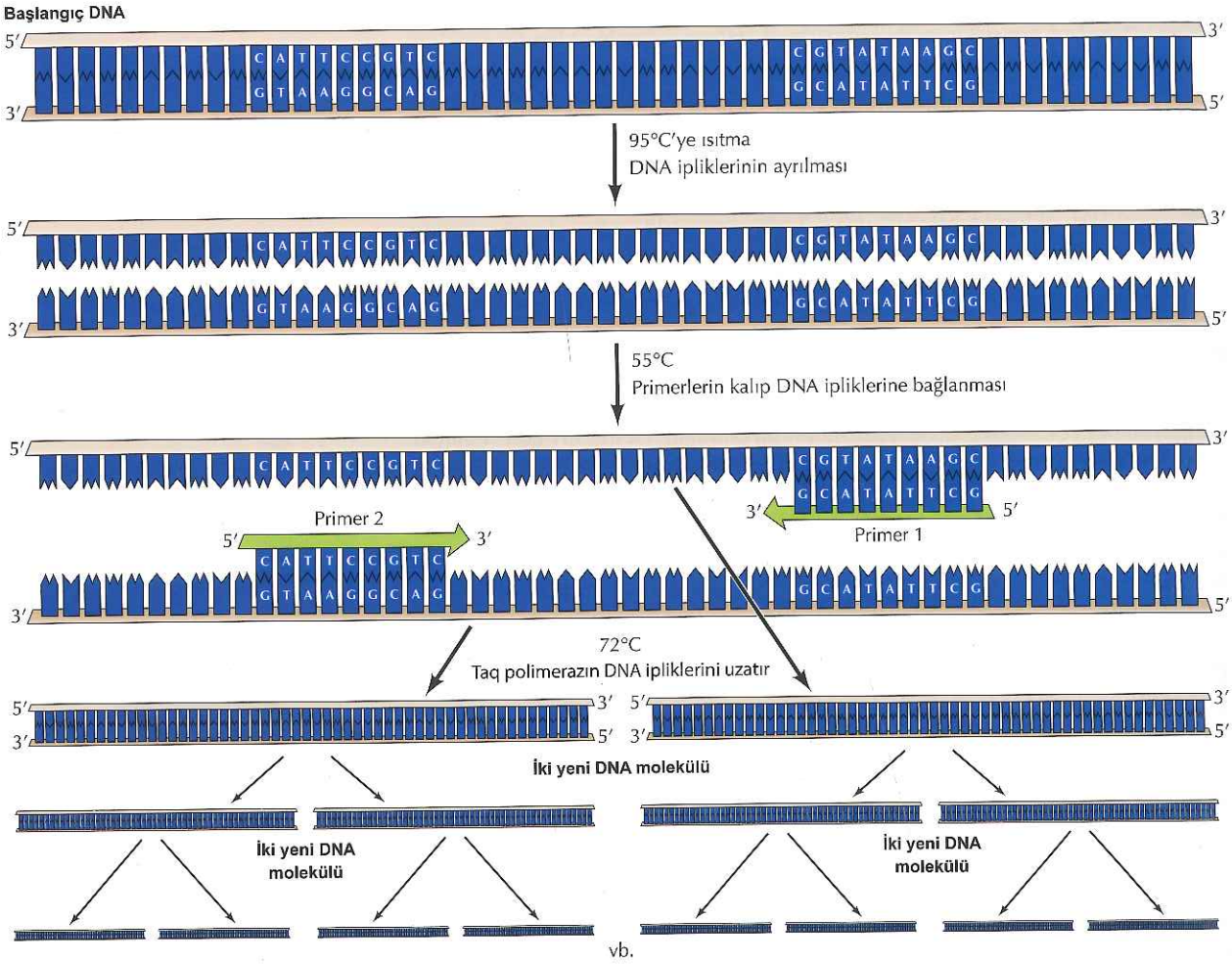
PCR son derece güçlü bir adli yöntem olmuştur. Olay yerindeki küçük bir DNA örneğinin PCR ile amplifikasyonu dedektiflere DNA profilini elde etme olanağı sağlamıştır.

Animasyon 4.9

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.9

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu yalnızca bir başlangıç DNA molekülünden bir DNA parçasının milyonlarca kopya çoğaltılmasına olanak sağlar.



Şekil 4.22 DNA'nın PCR ile çoğaltılması Çoğaltılacak DNA parçacığı, iki ucundan DNA sentezini başlatacak olan iki dizi ile sınırlanır. Başlangıçtaki çift iplikli DNA, ipliklerin birbirinden ayrılması için ısıtılır ve daha sonra, primerlerin (genelde 15-20 bazlık oligonükleotidler) her bir DNA ipliğine bağlanması için soğuması sağlanır. *Thermus aquaticus*'tan elde edilen DNA polimeraz (*Taq* polimeraz), primerlerden başlayarak yeni DNA ipliklerinin sentezinde kullanılır ve böylelikle iki yeni DNA molekülünün oluşumu sağlanır. İşlem her birinde mevcut DNA'nın iki katının elde edildiği, çoklu döngülerle tekrarlanır.

PCR işlemindeki çoklu ısıtma ve soğutma döngüleri, sıcaklık döngüleyici (*thermocycler*) denilen, programlanabilir ısıtma blokları ile sağlanır. Bu reaksiyonlarda kullanılan DNA polimerazlar, 75 °C civarındaki sıcaklıklarda sıcak su akıntılarında yaşayan *Thermus aquaticus* gibi bakterilerden elde edilen ve yüksek sıcaklıklarda kararlı olan enzimlerdir. Bu polimerazlar, DNA'nın çift ipliğinin birbirinden ayrılması için gerekli olan yüksek sıcaklıklarda bile kararlı oldukları için, PCR amplifikasyonu hızla ve otomatik olarak uygulanabilir. PCR amplifikasyonu öncesinde cDNA sentezlemek için revers transkriptaz kullanma koşulu ile, RNA dizileri de bu yöntemle amplifiye edilebilir.

Bir genin DNA dizisi, primerlerin özgün olarak bağlanmasına yetecek kadar biliniyorsa, PCR amplifikasyonu, diğer moleküllerle karışmış olarak bulunan çok az miktarda DNA veya RNA içeren örnekten başlayarak, kolayca saptanabilir ve kullanılabilir miktarlarda DNA elde edilmesini sağlayan çok güçlü bir yöntemdir. PCR tarafından, yalnızca reaksiyonda kullanılan primere eşlenik olan dizilere sahip DNA molekülleri çoğaltılır. Bu sayede, PCR, total hücresel DNA ve RNA gibi kompleks bir karışım içinde bulunan spesifik bir kalıbı seçici olarak amplifiye eder.

Önemli olarak, PCR, bir örnekteki özgün bir DNA veya RNA miktarını kantitatif olarak belirlemek için de kullanılabilmektedir. Bu yöntemler, PCR amplifikasyonu süresince oluşan çift zincir DNA miktarının ölçülmesi prensibine dayanır. Çift zincir DNA'ya bağlanan ve yalnızca bağlandığında floresan ışıma yapan bir floresan boya PCR reaksiyonuna eklenir. Daha sonra, amplifiye olan DNA'nın göstergesi olan floresan ışımanın yoğunluğu her PCR döngüsünden sonra takip edilir. Belirlenen döngü sonundan amplifiye olan DNA miktarı, başlangıçta var olan kalıp DNA miktarı tarafından belirlenirken, bu durum, örnekte bulunan DNA veya RNA'nın miktarını belirleme fırsatı vermektedir. Floresan ışıma PCR süresince devamlı olarak ölçüldüğünden bu yöntem gerçek zamanlı **(real-time) PCR** olarak adlandırılır. Bu yöntemin sıra dışı hassasiyeti, onu hücrelerde ve dokularda gen ekspresyonu analizi gibi çeşitli uygulamalarda önemli yapmaktadır.

Nükleik asit hibridizasyonu

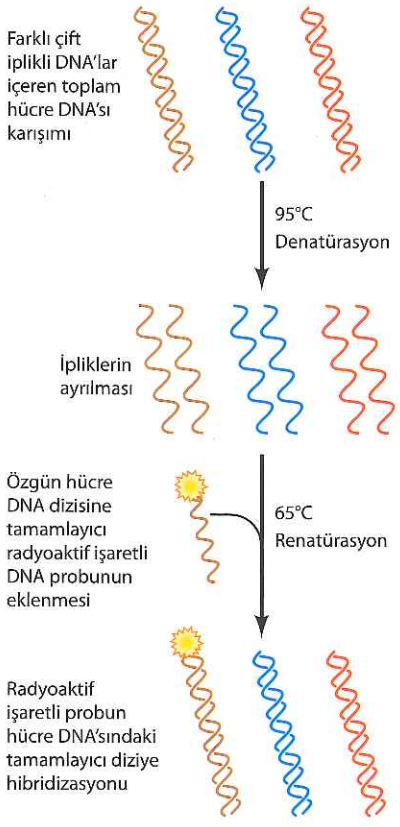
Özgün nükleik asit dizilerinin belirlenmesindeki en önemli aşama, RNA veya DNA'nın tamamlayıcı iplikleri arasındaki baz eşleşmeleridir. Yüksek sıcaklıklarda (örn., 90-100°C) DNA'nın iki tamamlayıcı ipliği birbirinden ayrılır (denatüre olur) ve tek iplikli moleküller elde edilir. Bu DNA iplikleri uygun koşullarda (örn., 65°C) inkübe edilecek olursa, tamamlayıcı baz eşleşmeleri yaparak, tekrar çift-iplikli forma dönüşürler. Bu olaya **nükleik asit hibridizasyonu** adı verilir. Nükleik asit hibridleri iki DNA ipliği arasında oluşabileceği gibi, iki RNA ipliği ya da bir DNA bir de RNA ipliği arasında da oluşabilir.

Yukarıda tartışıldığı gibi, primerler ile kalıp DNA arasındaki hibridizasyon PCR amplifikasyonunun özgünlüğünü sağlamaktadır. Ek olarak, diğer çeşitli yöntemler, klonlanmş bir DNA dizisi gibi izole edilen herhangi bir komplementer DNA veya RNA dizilimini saptamak için nükleik asit hibridizasyonunu bir araç olarak kullanırlar (**Şekil 4.23**). Klonlanan DNA radyoaktif işaretli nükleotidlerle veya floresan veya kemilüminesan olarak saptanabilen modifiye nükleotidlerle etiketlenebilirler. Etiketlenen bu DNA, eşleniği olan DNA veya RNA dizileri ile hibridizasyonda prob olarak kullanılır. Ardından, bu hibridizasyon çift zincirli hibridlerdeki radyoaktivite, floresan veya luminesan sayesinde saptanır.

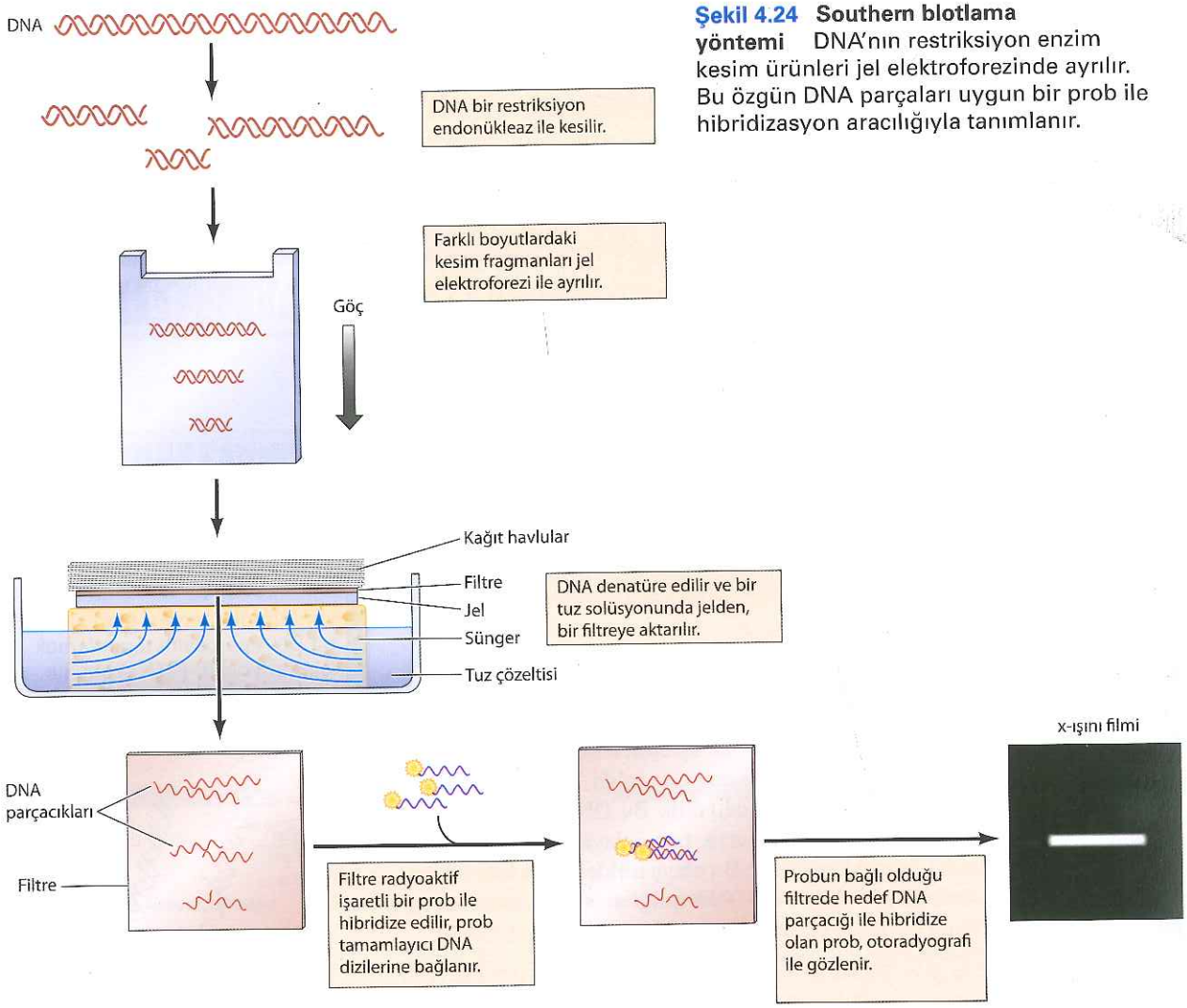
Southern blotlama (E. M. Southern tarafından geliştirilen bir yöntem),

Animasyon 4.10
sites.sinauer.com/cooper7e/a4.10
Nükleik Asit Hibridizasyonu Yüksek sıcaklıkta DNA'nın birbirini tamamlayan zincirleri ayrılır ve daha sonrasında soğutulduklarında, birbirini tamamlayıcı baz eşleşmesinin belirlediği şekilde çift zincirli DNA molekülleri tekrar oluştururlar.

Animasyon 4.11
sites.sinauer.com/cooper7e/a4.11
Southern Blot DNA parçaları, jel elektroforezi kullanılarak boyutlarına göre ayrılır ve sonrasında, Southern blot yönteminin parçası olarak, özel bir DNA parçasını tanımlamak için radyoaktif DNA probu ile inkübe edilirler.



Şekil 4.23 Nükleik asit hibridizasyonu ile DNA saptanması Toplam hücre DNA'sındaki özgün bir dizi, floresan veya kemilüminesan ışıyan radyoaktif nükleotid veya modifiye nükleotidlerle işaretli bir DNA probu ile hibridize edilerek saptanabilir. Tek iplikli molekülleri elde etmek için DNA 95°C'ye kadar ısıtılarak denatüre edilir. Daha sonra işaretli prob ilave edilerek sıcaklık 65°C'ye düşürülür ve tamamlayıcı DNA ipliklerinin birbirleri ile eşleşmesine izin verilir. Prob, hücre DNA'sındaki tamamlayıcı dizilerine bağlanır ve işaretli çift zincirli moleküller olarak saptanabilir.

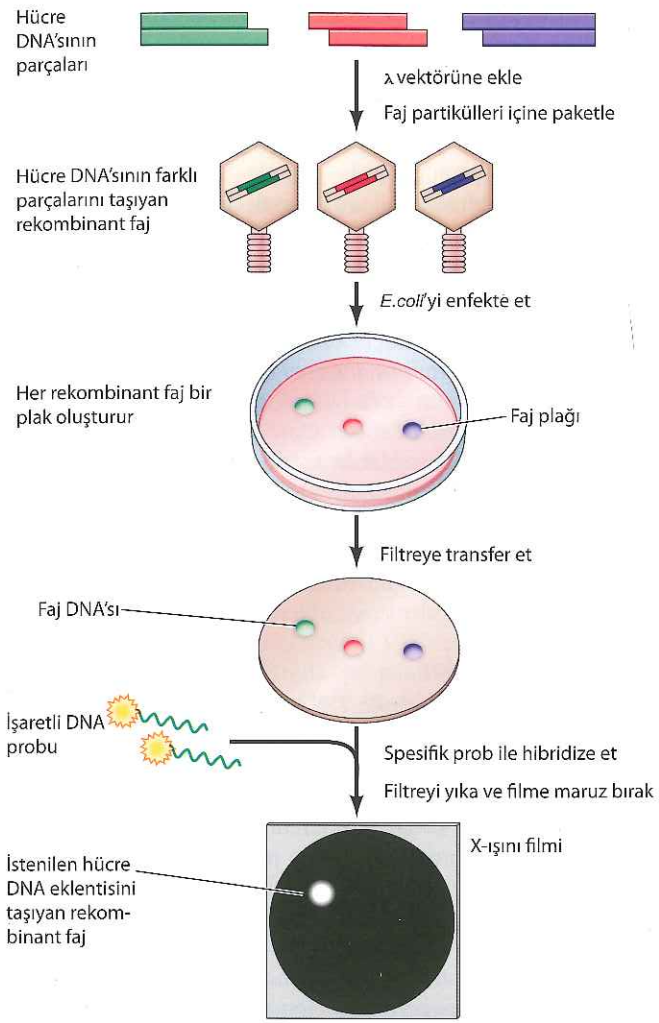


Şekil 4.24 Southern blotlama yöntemi DNA'nın restriksiyon enzim kesim ürünleri jel elektroforezinde ayrılır. Bu özgün DNA parçaları uygun bir prob ile hibridizasyon aracılığıyla tanımlanır.

hücresel DNA'daki özgün genlerin saptanması için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (**Şekil 4.24**). Analiz edilecek olan DNA, restriksiyon endonükleazlar ile kesilir ve oluşan DNA parçacıkları jel elektroforezi kullanılarak birbirinden ayrılır. Bu jel daha sonra, nitrosellüloz bir filtre ya da naylon bir zar üzerine aktarılır ve böylece DNA parçacıklarının zara geçmesi ile (blotlama) jelin tam bir kopyası elde edilir. Bu filtre daha sonra, eşlenik dizi içeren DNA fragmanı ile hybridize olan işaretli problar ile inkübe edilerek, spesifik hücresel DNA fragmanlarının görüntülenmesi sağlanır.

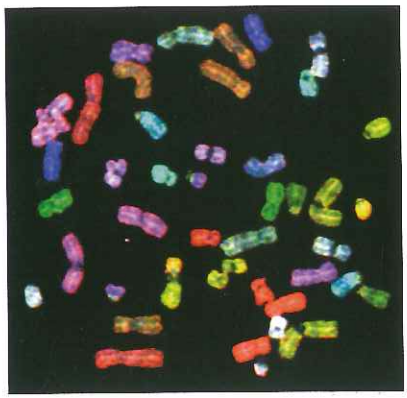
Northern blotlama yöntemi Southern blotlama yönteminin (dolayısıyla isminin) DNA yerine RNA saptanması için kullanılan farklı bir uygulamasıdır. Bu yöntemde, toplam hücre RNA'sı elde edilir ve jel elektroforezi yardımı ile büyüklük farkına göre ayrıştırılır. Southern blotlama yönteminde olduğu gibi, RNA'lar bir filtreye aktarılır ve bir radyoaktif prob ile hibridize edilerek saptanır. Northern blotlama sıklıkla gen ekspresyonu çalışmalarında- örneğin özgün bir mRNA'nın farklı hücrelerde var olup olmadığının araştırılmasında kullanılır.

Nükleik asit hibridizasyonu, spesifik hücresel DNA eklentilerini taşıyan



Şekil 4.25 Rekombinant bir kütüphanenin hibridizasyon ile taranması Hücre DNA'sının parçaları λ bakteriyofaj vektörüne klonlanır ve faj partiküllerinin içine paketlenerek farklı hücre DNA eklentilerini taşıyan rekombinant faj koleksiyonu oluşturulur. Fajlar bakterileri enfekte etmek için kullanılır ve kültürün üzerine bir filtre kapatılır. Her bir plaktaki fajlardan bir kısmı filtreye aktarılır. Daha sonra, istenilen geni içeren faj plağını bulmak için filtredeki fajlar işaretli prob ile hibridize edilir. Ardından, uygun faj plakları orijinal kültür kapından izole edilebilir.

moleküler klonları tanımlamak için de kullanılabilmektedir. Genomik DNA veya cDNA klonlarının her ikisinin izolasyonunda da ilk basamak, sıklıkla özel bir hücre tipine ait bütün genomik veya mRNA dizilerini içeren klon kolleksiyonu olan **rekombinant DNA kütüphanesinin** hazırlanmasıdır (**Şekil 4.25**). Örneğin, insan genomik DNA kütüphanesi, yaklaşık 15 kb boyutlarında randomize DNA parçalarının bir λ vektörüne klonlanması ile hazırlanabilir. İnsan genomu yaklaşık 3 milyon kb olduğundan, tam bir insan genomu bu şekilde 500,000 koloniden oluşan bir koleksiyon ile temsil edebilmektedir. Kendisine özgü prob bulunan herhengi bir gen bu rekombinant kütüphaneden izole edilebilir. Rekombinant fajlar petri kaplarında üretilen *E. coli* üzerine ekilir ve her faj bakteri kültürü üzerinde replike olarak plak oluşturur. Daha sonra plaklar, Sothern blotlamada uygulanan DNA'nın jelden filtreye transfer edilmesine benzer bir yöntemle filtre üzerine blotlanır ve filtreler ilgilenilen geni içeren faj plaklarını saptamak için işaretli prob ile hibridize edilir. Böyle bir deney için çeşitli problardan oluşan bir karışım kullanılabilir. Bir cDNA klonu, karşılığı olan genomik klonu izole etmek için prob olarak kullanılabilir veya bir türden elde edilmiş gen klonu (örneğin fare), farklı bir türden (örneğin insan)



Şekil 4.26 Florasan *in situ* hibridizasyon Yirmi dört kromozomun her birini ayrı renkte boyayan kromozoma-özgü floresan problar ile insan kromozomlarının hibridizasyonu (Uluslararası Kanser Enstitüsü'nden Thomas Reid ve Hesed Padilla-Nash'in izni ile kullanılmıştır).

ilişkili geni izole etmek için de kullanılabilir. Uygun plak, daha sonra, istenilen DNA eklentisini taşıyan rekombinant fajı çoğaltmak için orijinal petriden izole edilebilir. Benzer yöntemler plazmid DNA klonlarını taşıyan bakteriyel kolonileri taramak için de kullanılabilir. Böylece, spesifik klonlar faj ve plazmid kütüphanelerinden hibridizasyonla izole edilebilir.

Nükleik asit hibridizasyonu, sadece hücre özütlerindeki homolog DNA ya da RNA dizilerini saptamada değil, aynı zamanda **-*in situ* hibridizasyon** olarak adlandırılan bir yöntemle, kromozomlar ya da bütünlüğünü koruyan hücrelerde de kullanılabilir (Şekil 4.26). Bu durumda, bir hücre ya da hücreyi oluşturan alt elemanlardan birine özgün olarak hazırlanan radyoaktif ya da floresan prob ile hibridizasyon, mikroskopik olarak incelenir. Örneğin, ilgilenilen bir genin kromozom üzerindeki yerleşimini belirlemek için işaretli prob, bütünlüğü bozulmamış kromozomlar ile hibridize edilebilir. *In situ* hibridizasyon, bir dokudaki farklı hücre tiplerinde özgün mRNA'ların saptanması için de kullanılabilmektedir.

Animasyon 4.12
sites.sinauer.com/cooper7e/a4.12
Koloni Hibridizasyonu
Bakteriler rekombinant DNA kütüphanelerine ev sahipliği yapabilirler ve bu kütüphane içindeki özel rekombinant DNA molekülleri, özel radyoaktif DNA probu ile inkübasyon prensibine dayalı bir yöntem olan koloni hibridizasyon yöntemi ile tanımlanabilirler.

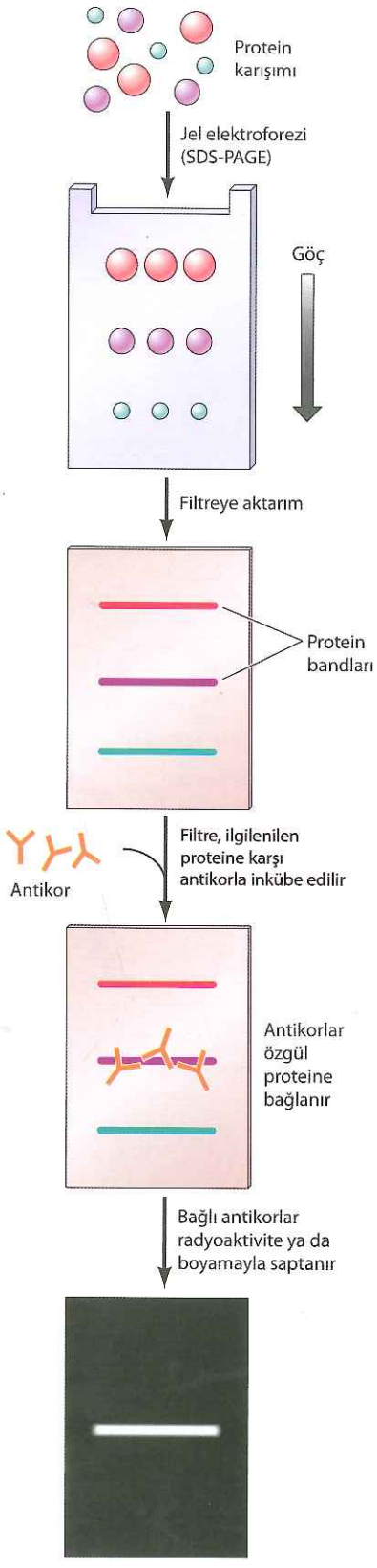
Protein probları olarak antikorlar

Gen ekspresyonu ve işlevinin incelenmesinde, DNA ve RNA'nın saptanmasının yanı sıra özgün proteinlerin de incelenmesine gerek vardır. Bu tip çalışmalarda, bir protein molekülü ile seçici olarak etkileşen **antikorlar**, işaretli nükleik asit problarının yerini alır. Antikorlar, bağışıklık sistemi hücreleri (B lenfositler) tarafından üretilen ve konakçı hücrenin yabancı cisim olarak tanıdığı–örneğin bir virüsün zarf proteinleri gibi, moleküllerle (**antijenler**) etkileşen proteinlerdir. Omurgalıların bağışıklık sistemi, her biri tek bir özgün antijeni (protein ya da karbohidrat veya biyolojik olmayan moleküller olabilir) tanıyabilecek, milyonlarca farklı antikor üretebilecek kapasitededir. Her bir lenfosit sadece tek bir tip antikor üretir, ancak bağışıklık sisteminin gelişimi sırasındaki programlanmış gen düzenlenmeleri sonucunda, farklı lenfositlerin antikor kodlayan genleri farklıdır (bkz. Bölüm 7). Bu çeşitlilik, farklı antijenlere yanıt verebilmek için programlanmış, farklı antikor genlerini taşıyan bir lenfosit dizininin oluşumunu sağlar.

Animasyon 4.13
sites.sinauer.com/cooper7e/a4.13
Monoklonal Antikorlar
Monoklonal antikorlar bir hayvanın (örneğin bir fare) bir antijenle aşılanması ile yapılabilir. İmmün cevabın gelişmesi için hayvana zaman verilmesi, hayvandan B hücrelerinin tolanması ve B hücrelerinin uzun ömürlü miyoloma hücreleri ile füzyonu sonucu oluşan hibridomlar kullanışlı bir antikorun üretilmiş olup olmaması için test edilebilir.

Antikorlar, bir hayvanın yabancı bir proteinle karşılaşması ile elde edilebilir. Örneğin, insan proteinlerine karşı geliştirilen antikorlar sıklıkla, tavşanlardan üretilir. Bu gibi bağışık (immünize) hayvanların serumları, immünize edici antijen üzerindeki pek çok farklı bölge ile reaksiyona giren bir antikor karışımı (farklı lenfositler tarafından üretilen antikorlardan oluşan) içerir. Bununla birlikte, bağışık hayvanlardan (genellikle fareler) elde edilen klonal B lenfosit dizilerinin kültürü ile, tek tür antikorlar (**monoklonal antikorlar**) da üretilebilir. Her lenfosit sadece bir tip antikor üretmeye programlanmış olduğu için, tek bir lenfosit klonundan elde edilen hücre dizisi yalnızca tek bir antijenik bölgeyi tanıyan monoklonal antikor üreteceği için, özgünlüğü çok yüksek immünolojik ayıraçlar elde edilecektir.

Antikorlar, hücrelerden saflaştırılan proteinlere karşı sentezlenebildikleri gibi, bağışıklık için diğer maddeler de kullanılabilir. Örneğin hayvanlar, kanser hücreleri gibi özgün bir hücre tipi tarafından eksprese edilen bilinmeyen proteinlere karşı antikor üretmek üzere, bütün halindeki hücrelerle de immünize edilebilir. Bu gibi antikorlar, immünizasyon için kullanılan hücre tipinin ürettiği özgül proteinleri saptamak için kullanılabilir. Buna ek olarak,



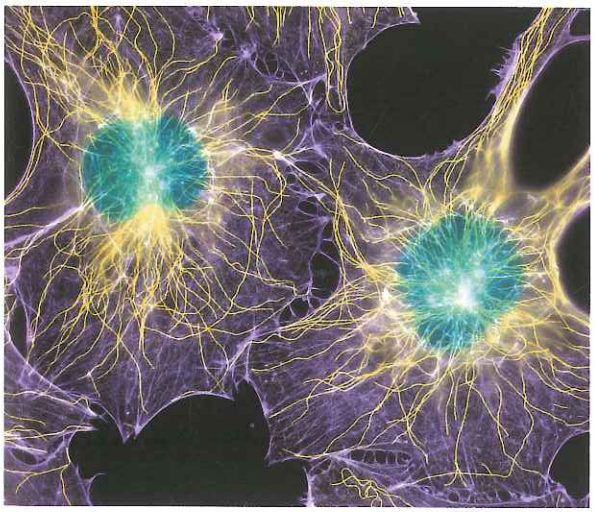
Şekil 4.27 İmmünblotlama

rekombinant bakteri klonlarının eksprese ettiği proteinlere karşı da antikorlar elde edilebilir. Bu yolla, moleküler klonlama, ökaryot hücrelerden elde edilmesi zor olan proteinlere karşı antikorların oluşturulmasına da yardımcı olur.

Ayrıca antikorlar, bir proteinin tamamına karşı değil, 10-15 amino asitten oluşan sentetik peptilere karşı da oluşturulabilir. Böylelikle bir genin DNA dizisi bilindiğinde, bu genin olası protein dizisi kullanılarak sentezlenen peptidlere karşı antikorlar oluşturulabilir. Bu sentetik peptitlere karşı sentezlenmiş olan antikorlar, sıklıkla, proteinin tamamına karşı da reaksiyon verdiği için, sadece klonlanmış bir gen dizisinden başlayarak, bir proteine karşı antikorlar üretmek mümkündür.

Antikorlar, hücre özütlerindeki proteinlerin saptanması için birçok farklı şekilde kullanılabilir. En yaygın kullanılan yöntem olan **immünblotlama (Western blotlama** olarak da adlandırılır) (Şekil 4.27), Southern blotlama yönteminin diğer bir varyasyonudur. Hücre özütlerindeki proteinler, ilk olarak, jel elektroforezi aracılığı ile büyüklüklerine göre ayrılır. Proteinler farklı şekil ve farklı elektrik yüklerine sahip olduğu için, bu süreç, nükleik asit elektroforezi için kullanılan yöntemde bazı değişikliklerin yapılmasını gerektirir. Proteinler, **SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)** olarak bilinen ve proteinlerin, negatif yüklü bir deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren bir çözelti içinde çözündüğü bir yöntemle ayrıştırılırlar. Her bir protein, proteini denatüre eden ve proteinin tamamına negatif yük veren, çok sayıda deterjan molekülüne bağlanır. Bu koşullar altında proteinlerin tamamı pozitif elektroda doğru göç ederler – göç hızları sadece büyüklükleri ile belirlenir (nükleik asitlerde olduğu gibi). Elektroforez işleminden sonra, proteinler, ilgilenilen proteinlere karşı antikorlar ile reaksiyona girebilecekleri bir filtreye aktarılır. Antikorun hedeflendiği proteini belirlemek için filtreye tutunan antikorlar, kemilüminesans gibi, farklı yöntemler kullanılarak saptanabilir.

Bölüm 1'de anlatıldığı gibi antikorlar, parçalanan hücrelerde olduğu kadar, bütünlüğü bozulmamış hücreler içindeki proteinlerin görüntülenmesinde de kullanılabilirler. Örneğin, hücreler floresan boyalarla işaretlenmiş antikorlarla



Şekil 4.28 İmmünofloresan Kültür ortamındaki insan hücrelerinde aktin (mor) ve tübülin (sarı) immünfloresan işaretli antikorlar ile boyandı. Çekirdekler yeşil floresan boya ile boyandı.

boyanabilir ve antijen olarak kullanılan proteinlerin hücre içi yerleşimleri floresan mikroskobu ile görüntülenebilir (Şekil 4.28). Antikorlar aynı zamanda, ağır metaller gibi, elektron mikroskobu ile görüntülenebilen belirteçlerle de işaretlenebilir ve bu etiketler, antijenik proteinlerin ayrıntılı yapısal düzeyde görüntülenmesine olanak verir.

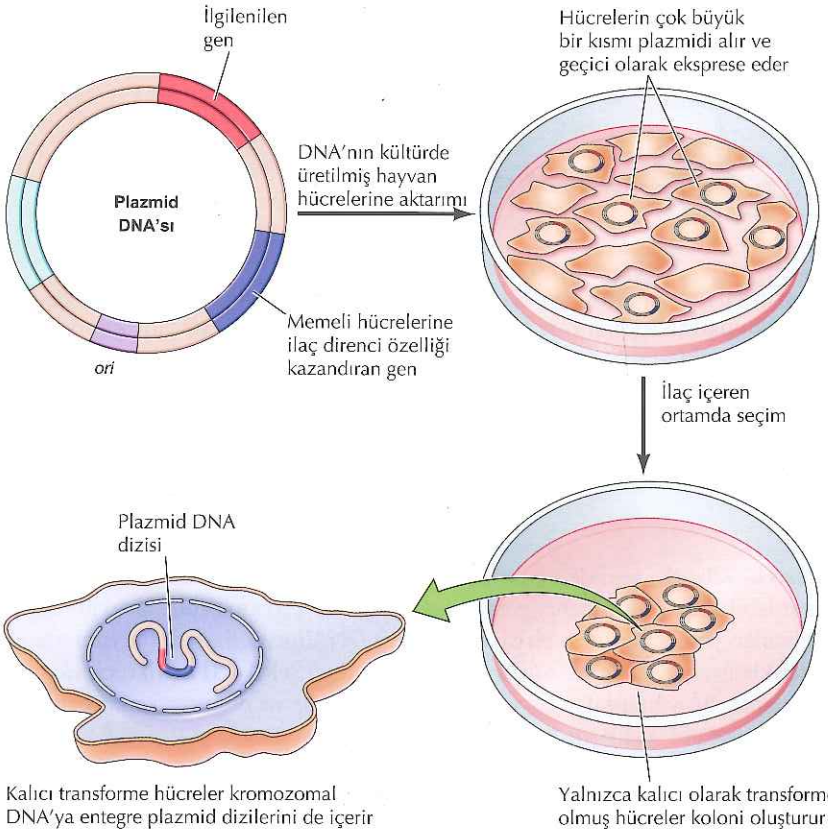
Ökaryotlarda Gen Fonksiyonu

Önceki bölümlerde tartışılan rekombinant DNA teknikleri, ökaryot genlerin izolasyonu ve yapılarının detaylı olarak anlaşılmasında güçlü teknikler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bir genin işlevinin anlaşılması için, genin sadece bakteride moleküler klonlanması yetmemekte, bütünlüğünü koruyan hücreler ve organizmalar içinde de çalışılması gerekebilmektedir. Klasik genetikte genlerin işlevlerinin anlaşılması, genellikle, mutant organizmaların değişmiş fenotiplerinin incelenmesi ile mümkündür. Rekombinant DNA'nın ortaya çıkışı, gen fonksiyon çalışmalarına yeni bir boyut getirmiştir. Klonlanmış DNA'nın, kültüre edilen hücre içine veya bütünlüğü bozulmamış orgarnizmaya yeniden verilmesi ile klonlanmış bir genin işlevlerinin araştırılması mümkün hale gelmiştir. Bu uygulamalar, *in vitro* koşulda klonlanmış DNA'da mutasyon oluşturulma olanağı ile eşleştirildiğinde, rekombinant DNA çalışmalarının gücü daha karmaşık organizmaların gen fonksiyonu çalışmalarına olanak sağlayacak şekilde artar.

Bitkilerde ve hayvanlarda gen aktarımı

Karmaşık yapıdaki ökaryot hücreleri, bakteri ve mayalarda kolaylıkla uygulanabilen basit genetik işlemler için uygun olmamakla birlikte, gen işlevleri, klonlanmış DNA'nın hayvan ya da bitki hücrelerine aktarılması ile çalışılabilir. Bu tip deneylerin (**gen aktarımı** olarak adlandırılır), gen ekspresyonu ile protein işlenmesi mekanizmalarını da içeren, çok sayıda soruyu cevaplamak için kritik olduğu kanıtlanmıştır. Buna ek olarak, bu kitabın sonraki bölümlerinde tartışıldığı gibi, gen aktarımı, insan kanser hücrelerinin anormal şekilde çoğalmasından sorumlu bir dizi geni de kapsayacak şekilde, hayvan hücre çoğalma ve farklılaşmasını denetleyen genlerin belirlenmesini ve nitelendirilmesini olanaklı kılmıştır.

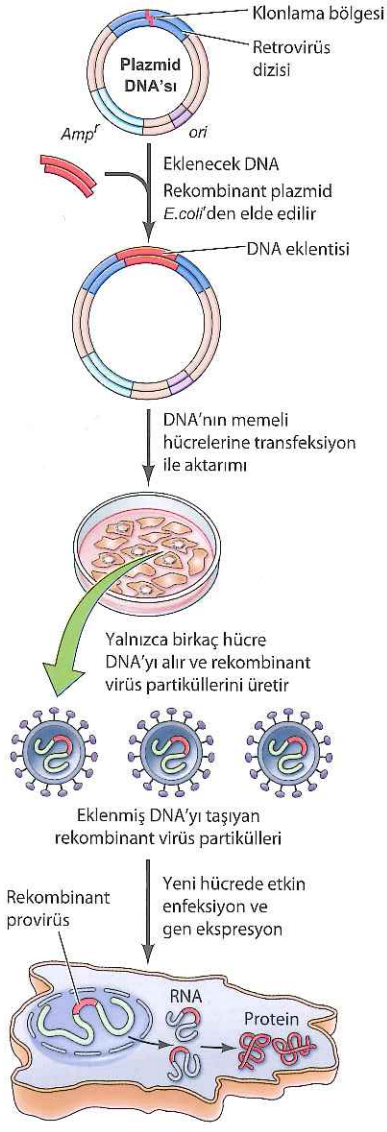
DNA'nın hayvan hücrelerine verilmesi yöntemi, başlangıçta enfeksiyöz viral DNA'lar kullanılarak geliştirildiği için, bu işlem **transfeksiyon** (transformasyon + enfeksiyon kelimelerden köken alan bir kelime) olarak adlandırılmıştır (Şekil 4.29). DNA, kültürdeki hayvan hücrelerinin içine; hücre çekirdeğine mikroenjeksiyon, DNA'nın kalsiyum fosfat ile birlikte çökerek oluşturduğu partiküllerin hücre içine alınması, DNA'nın plazma zarı ile kaynaşan lipid vezikülleri (**lipozomlar**) içinde veya hücrenin plazma zarına kısa elektrik akımı uygulaması ile geçici olarak açılan porlardan (**elektroporasyon**) hücreye sokulmasını içeren, farklı yöntemler kullanılarak aktarılabilir. Hücrelerin büyük bir kısmı tarafından içeri alınan DNA çekirdeğe taşınır ve burada birkaç gün boyunca transkribe olur – bu olay **geçiçi ekspresyon** olarak adlandırılır. Hücrelerin küçük bir kısmında ise (%1 ya da daha az) yabancı DNA, hücre genomuna kalıcı olarak bağlanır ve hücre bölünmesi sırasında tıpkı, hücresel diğer genleri gibi, yavru hücrelere aktarılır. Eğer transfekte DNA'lar normal hücrelerin kültürde çoğalmasını engelleyen bir ilaca karşı direnç gibi bir seçici özellik taşıyorsa, kalıcı olarak transfekte olan bu hücreler kültürden izole edilebilirler. Bundan dolayı, klonlanmış herhangi bir gen bir memeli hücresine, kalıcı olarak transfekte olmuş hücreleri seçmede kullanılan bir ilaç direnci belirleyicisi ile birlikte aktarılabilir. Klonlanmış bu genin hücre davranışları –örneğin, hücre çoğalması veya farklılaşması gibi– üzerine etkileri bu yolla araştırılabilir.



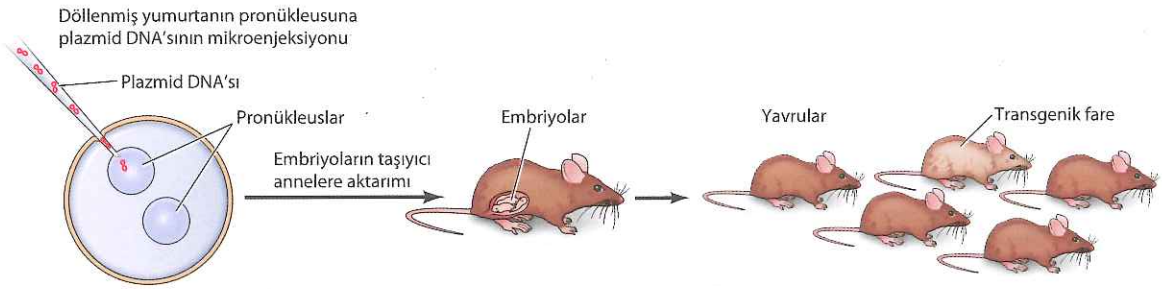
Şekil 4.29 Hayvan hücrelerine DNA aktarımı İlgilenilen bir ökaryotik gen, kültürdeki hayvan hücrelerinde seçilimini sağlayacak bir ilaç direnç belirleyicisi içeren plazmid içine klonlanır. Plazmid DNA'sı kültürdeki hücrelerin büyük bir kısmı tarafından alınır ve birkaç gün boyunca eksprese edilir (geçici ekspresyon). Plazmid DNA'sının kromozom DNA'sı içine kalıcı olarak entegre olduğu, kalıcı transforme hücreler, ilaç içeren besi ortamında üreme yetenekleri nedeniyle seçilebilirler.

Hayvan virüsleri de klonlanmış DNA'ların hücrelere daha etkin olarak aktarılmasında vektör olarak kullanılabilir. Bu alanda retroviruslar, döngüleri viral DNA'nın hücre genomuna kalıcı bağlanmasını gerektirdiği için, özellikle tercih edilmektedir (Şekil 4.30). Sonuçta, retroviral vektörler klonlanmış genlerin farklı hücrelere etkin olarak aktarılmasında kullanılabildiği için, geniş çapta uygulamaların önünü açan önemli taşıyıcı moleküllerdir.

Klonlanmış genler, hücre kültürleri yerine canlı hayvanlarda çalışılmasını



Şekil 4.30 Retroviral vektörler Retroviral diziler içeren bir vektör, *E. coli* içinde çoğalabilmesi için bir plazmid içine klonlanır. Yabancı DNA viral diziler arasına yerleştirilir ve rekombinant plazmid bakteriden izole edilir. Hayvan hücre kültürleri bu rekombinant DNA ile transfekte edilir. Bu DNA, eklenen DNA'yı taşıyan rekombinant retrovirüsleri oluşturacak hücrelerin küçük bir kısmı tarafından alınır. İçinde klonlanmış DNA parçacığını taşıyan viral genom, provirüs gibi davranarak, kromozom DNA'sı içine yerleşir. Bu rekombinant retrovirüsler yeni hücrelerin etkin bir şekilde enfekte edilmesinde kullanılır.



Şekil 4.31 Transgenik fare üretimi DNA, döllenmiş fare yumurtasının pronükleusuna (döllenmiş yumurta, birisi sperm diğeri yumurtadan köken alan iki adet pronükleus taşır) mikroenjeksiyon ile aktarılır. Mikroenjeksiyon işlemi geçirmiş olan yumurtalar daha sonra taşıyıcı anneye aktarılarak gebelik devam ettirilir. Oluşan yavrulardan bazıları (transgenik yavrular) enjekte edilen DNA'yı genomları içine almış durumdadır.

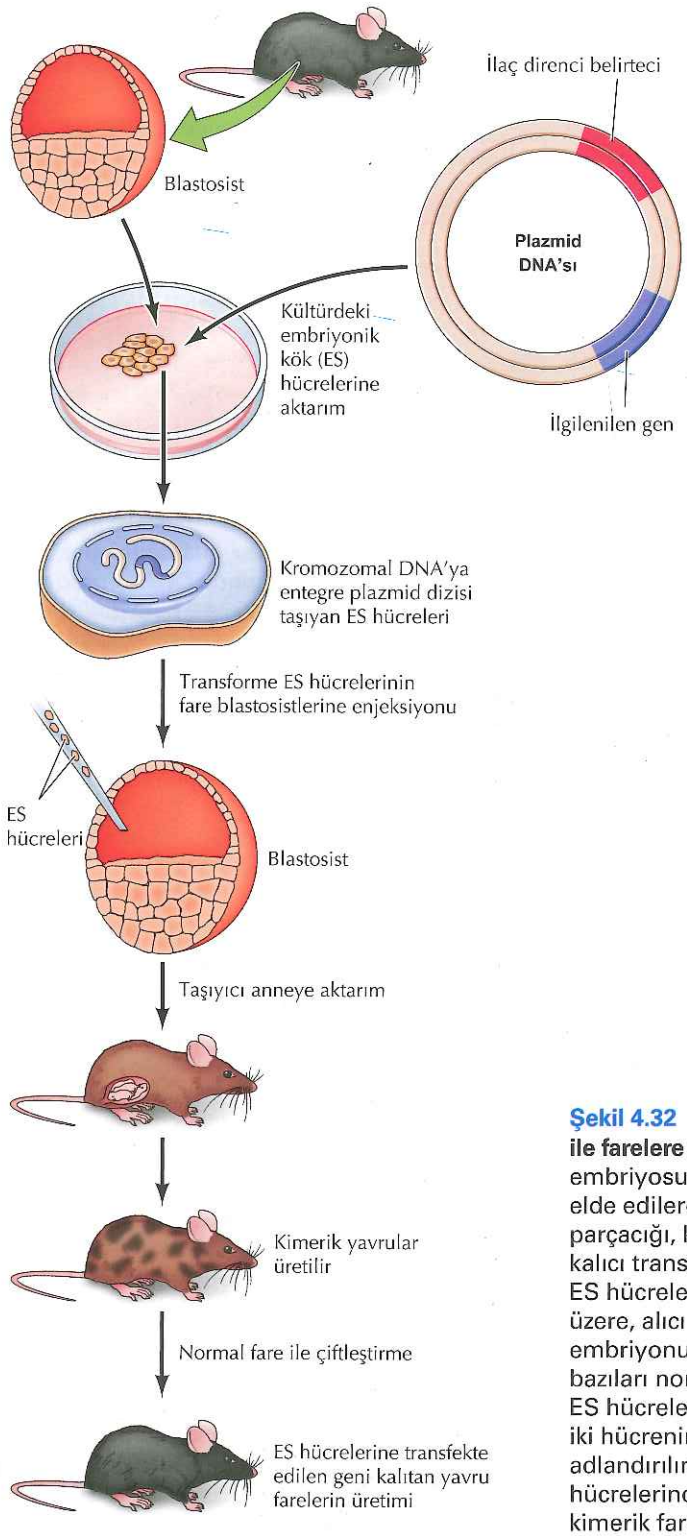
olanaklı kılacak şekilde, çok hücreli organizmaların germ hücrelerine de aktarılabilir. Bu gibi yabancı genleri taşıyan fareleri (**transgenik fare**) üretmede kullanılan yöntemlerinden birisi, klonlanmış DNA'nın döllenmiş bir yumurtanın pronükleusu içine doğrudan mikroenjeksiyonudur (Şekil 4.31). Mikroenjeksiyon uygulanan bu yumurtalar taşıyıcı annelere aktarılır ve doğuma kadar beklenir. Yavru farelerin yaklaşık %10 kadarında yabancı DNA, döllenmiş yumurta genomuna kalıcı olarak bağlanır ve böylelikle hayvanın tüm hücrelerinde bu DNA bulunur. Yabancı DNA somatik hücrelerin yanısıra germ hücrelerinde de mevcut olduğu için, bu DNA'yı taşıyan yeni nesillerin döllenme yolu ile oluşması da sağlanır.

Embriyonik kök (ES) hücrelerinin özellikleri, klonlanmış genlerin fareye aktarılmasına farklı bir açılım kazandırmıştır (Şekil 4.32). Erken fare embriyolarından ES hücreleri elde edilerek kültürde üretilebilir. Bu hücreler, normal gelişim aşamalarına devam ederek, germ hücreleri dahil, fare dokularının tüm hücrelerini oluşturmak üzere erken embriyolara yeniden aktarılabilir. Böylece, klonlanmış DNA'nın kültürdeki ES hücreleri içine aktarımı, kalıcı olarak transforme olmuş hücrelerin kültür ortamında seçilmesi ve tekrar fare embriyosuna aktarımı olanaklı hale gelmektedir. Bu tip embriyolar, normal embriyo hücreleri ile bazı transfekte ES hücrelerinden köken alan kimerik döller oluşturur. Bu yapıdaki farelerin bazılarında, transfekte edilmiş ES hücreleri germ hattına katılır. Bu farelerin döllenmesi yoluyla, transfekte genin yeni kuşaklara doğrudan kalıtımı olanaklı hale gelmektedir.

Klonlanan DNA'lar çeşitli yöntemler kullanılarak bitki hücrelerinin içine de yerleştirilebilir. Çok sayıda bitki kültüre edilen tek bir hücreden yeniden oluşabildiğinden (bkz. Bölüm 1), transgenik hayvan üretmekten çok daha basit bir yötemle, içine rekombinant DNA yerleştirilmiş olan hücrelerden, kültür ortamında, transgenik bitkiler doğrudan oluşturulabilir. Gerçekten, ekonomik olarak önemli olan mısır, domates, soya fasülyesi ve patates gibi çok sayıda bitki türünün transgenik çeşitleri üretilmiştir.

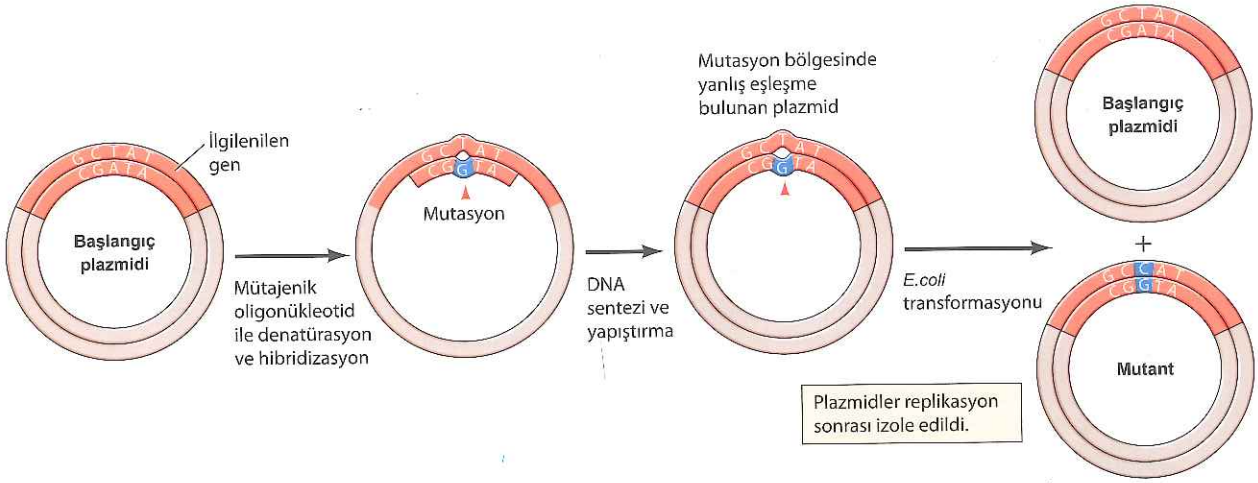
Klonlanmış DNA'larda mutasyon oluşturma

Klasik genetik çalışmalarda (örn., bakteri ve mayalarda yapılan) mutantlar, mutant organizmalardaki değişmiş fenotiplerin incelenmesi ile genleri



Şekil 4.32 Genlerin embriyonik kök hücreler aracılığı ile farelere aktarımı Embriyonik kök (ES) hücreler fare embriyosunun erken dönemlerinden (blastosist dönemi) elde edilerek kültürde üretilir. İstenilen klonlanmış DNA parçacığı, kültür ortamındaki bu hücrelere aktarılabilir ve kalıcı transforme ES hücreleri elde edilebilir. Bu transforme ES hücreleri embriyonun normal gelişimine katılmak üzere, alıcı blastosistlere enjekte edilir. Taşıyıcı anneye bu embriyonun transferinden sonra oluşan yavru farelerin bazıları normal blastosist hücrelerini, bazıları ise transforme ES hücrelerinden köken alan hücreleri içerir. Bu fareler iki hücrenin karışımından oluştuğu için kimerik olarak adlandırılırlar. Değiştirilmiş gen taşıyan yavru kuşaklar germ hücrelerinde de transforme olmuş ES hücrelerini taşıyan kimerik farelerin birbirleri ile döllenmesi ile oluşturulabilir.

saptamak ve işlevlerini araştırma yönünden büyük öneme sahiptir. Bu tip çalışmalarda, mutant genler sıcaklığa duyarlı veya özel beslenme koşulu gerektirme gibi, gözlenebilir fenotipik değişikliklere sahip oldukları için



Şekil 4.33 Sentetik oligonükleotidler ile mutagenez İstenilen baz değişikliğini taşıyan oligonükleotid, plazmid DNA'sında DNA sentezini başlatmak için kullanılır ve DNA ligaz ile DNA çembersel hale getirilir. Bu işlem sonucunda elde edilen plazmid, bir ipliğinde normal, diğer ipliğinde ise mutant bazı taşır. *E. coli*'ye transformasyon sonrasında plazmid DNA replikasyonu ile hem başlangıç, hem de mutant plazmidlerin bir karışımı elde edilir.

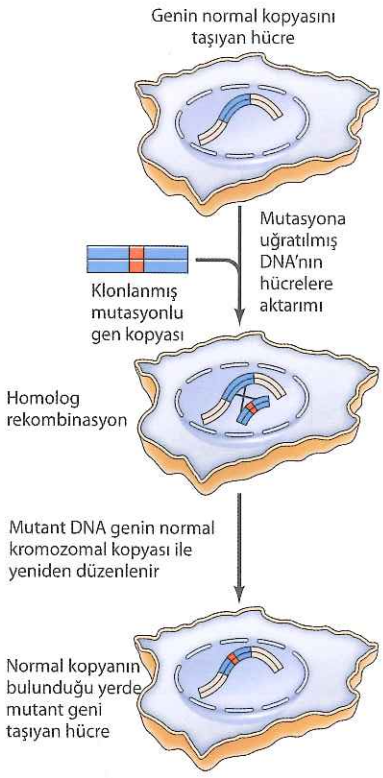
kolaylıkla saptanabilirler. Genlerin rekombinant DNA ile belirlenmesi, mutasyon oluşturma (mutagenez) çalışmalarına farklı bir yaklaşım getirmiştir. Bugün, klonlanmış herhangi bir gende, isteğe bağlı mutasyon oluşturmak ve bunun fonksiyon üzerindeki etkilerini saptamak olanaklıdır. Klonlanmış DNA'lar üzerinde özgün mutasyonların oluşturulabilmesinin (***in vitro* mutagenez**), ökaryotik genlerin ekspresyon ve fonksiyonlarının çalışılmasında güçlü bir araç olduğu kanıtlanmıştır.

Klonlanmış genlerde *in vitro* mutagenez işlemi kullanılarak, delesyon, insersiyon veya tek baz değişikliği yaratma gibi, pek çok değişiklik oluşturulabilir. Nükleotidlerde değişiklik oluşturmak için sentetik oligonükleotidlerden yararlanma, yaygın olarak kullanılan bir mutagenez yöntemidir (Şekil 4.33). Bu işlemde istenen mutasyonu taşıyan sentetik bir oligonükleotid DNA sentezinde primer olarak kullanılır. Yeni sentezlenen ve mutasyonu içeren DNA molekülü, daha sonra, izole edilerek karakterize edilir. Örneğin, protein işlevindeki görevini belirlemek için, bir proteindeki özgün bir amino asit değiştirilebilir.

Bu uygulamanın, rekombinant DNA molekülü üzerinde değişiklik yapmaya yarayan diğer yöntemler ile birlikte kullanılan farklı varyasyonları, klonlanmış bir gende istenen herhangi bir değişikliği yapabilmeyi olanaklı kılmaktadır. Bu mutasyonların, gen ekspresyonu ve fonksiyonu üzerinde etkisi, genin uygun tipte bir hücre içine aktarılması ile belirlenebilir. Böylelikle *in vitro* mutagenez, klonlanmış genlerin düzenleyici ve protein kodlayan dizinlerinin, işlevsel rollerinin ayrıntılı olarak belirlenmesine olanak sağlar.

Hücresel genlerde mutasyon oluşturma

Klonlanmış genlerin hücrelerin içine aktarımı (özellikle *in vitro* mutagenez ile birlikte), gen yapısı ve işlevini çalışmayı olanaklı kılan güçlü bir yaklaşım olsa da, bir hücre ya da bütünlüğü bozulmamış bir organizmadaki bilinmeyen bir genin işlevinin ne olduğunun anlaşılması için yeterli değildir. Klonlanmış

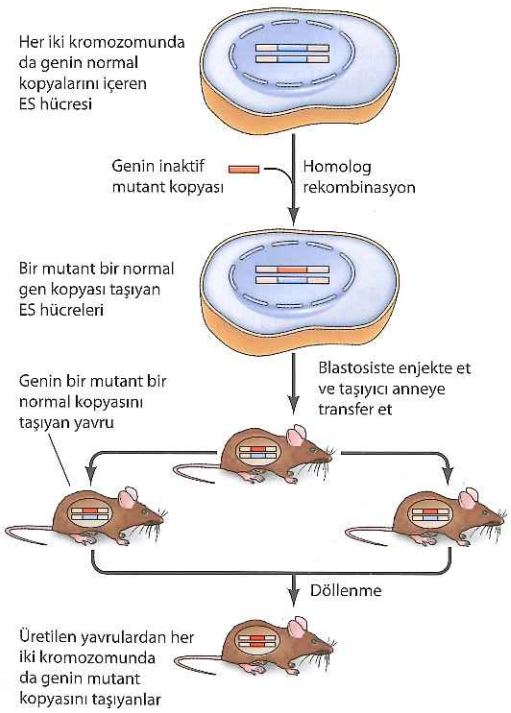


Şekil 4.34 Homolog rekombinasyon ile gen inaktivasyonu Klonlanan genin mutasyona uğratılmış kopyası hücreye aktarılır. Klonlanmış gen homolog rekombinasyon yolu ile normal gen kopyasının yerini alabilir ve böylece kromozom DNA'sı içinde istenilen mutasyonu taşıyan bir hücre elde edilir.

genlerin aktarımında alıcı hücreler, kromozomal DNA'larında genin normal ve işlevsel kopyalarına sahip olan hücrelerdir. Bu nedenle, klonlanmış bir genin biyolojik rolünün belirlenebilmesi için, bu normal gen kopyalarının ortadan kaldırılması gereklidir. Hem kültür hücrelerinde hem de transgenik farelerde, klonlanan genlerin kromozomal kopyalarını inaktive etmek veya normal gen fonksiyonunu baskılamak için çok sayıda yaklaşım kullanılabilmektedir.

Mayalarda kromozom genlerinin mutasyona uğratılması, mayaya aktarılan DNA'nın mayanın kromozom kopyaları ile sıklıkla **homolog rekombinasyon** yapması nedeniyle, göreli olarak daha kolaydır (Şekil 4.34). Homolog rekombinasyonda, klonlanmış maya geni normal allelin yerine geçer, böylelikle klonlanmış gende oluşturulan mutasyon maya geninin kromozom kopyası ile *in vitro* oltamda birleştirilmiş olur. Genlerin hücresel işlevlerdeki rollerini anlamak için en basit uygulama, normal gen kopyasının yerine, klonlanmış geni etkisizleştiren (***knockout***) mutasyonların aktarılmasıdır.

Hücreye aktarılan DNA ile, buna homolog olan kromozomal gen arasındaki rekombinasyon memeli hücrelerinde nadir olarak gözlenen bir olaydır. Bu nedenle, gen aktivitesinin engellenmesi yaklaşımının memeli hücresinde uygulanması, teknik olarak daha zordur. Ancak, homolog rekombinasyona bağlı oluşan transforme hücreleri seçmek ve izole etmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir



Şekil 4.35 Homolog rekombinasyonla ES hücrelerinde oluşturulan mutasyonlarla mutant fare üretimi Homolog rekombinasyon, embriyonik kök (ES) hücrelerde normal bir genin inaktif mutant kopyası ile yer değiştirilmesinde kullanılır. Sonuçta, homolog kromozomlarından birinde mutant diğerinde normal gen kopyası taşıyan ES hücreleri oluşturulur. Bu ES hücreleri blastosistlere transfer edilebilir ve Şekil 4.32'de anlatıldığı gibi fare üretiminde kullanılır. Bir mutant ve bir de normal gen kopyası taşıyan bu fareler, her iki kromozomunda genin mutant kopyalarını taşıyan yavrular üretmek için eşleştirilebilirler.

ve böylece memeli hücrelerinde istenilen bir geni inaktive etmek mümkün hale gelmiştir. Önemli olarak, fare (ES) hücrelerinde genler kolaylıkla inactive edilebilmekte ve bunlar transgenic fare üretiminde kullanılmaktadır (**Şekil 4.35**). Bu fareler, hedeflenen genin her iki homolog kromozomdaki kopyasını mutant olarak bulunduran nesiller vermek üzere yavrulattırılabilirler ve bu bağlamda, yaşayan hayvan üzerinde genin inaktivasyonunun etkileri araştırılabilir. Ayrıca, mutant gen kopyalarını taşıyan fare embriyolarından alınan hücreler kültüre edilebilir, böylece genin fonksiyonu kültüre edilen hücreler kullanılarak da araştırılabilir. Bu yolla, 7000'den fazla genin biyolojik aktivitesi araştırılmıştır ve bu çalışmalar fare gelişimininde rol oynayan çok sayıda genin anlaşılmasında kritik öneme sahip olmuştur. Ayrıca, özel fare dokularından çalışma yapmak üzere koşullu gen susturması (knockout) yöntemleri geliştirilmiştir. Böylelikle, organizmanın bütün hücrelerinden ziyade belirli bir hücre tipinde (örneğin, sinir hücrelerinde) genin fonksiyonunun belirlenmesine fırsat tanınmıştır.

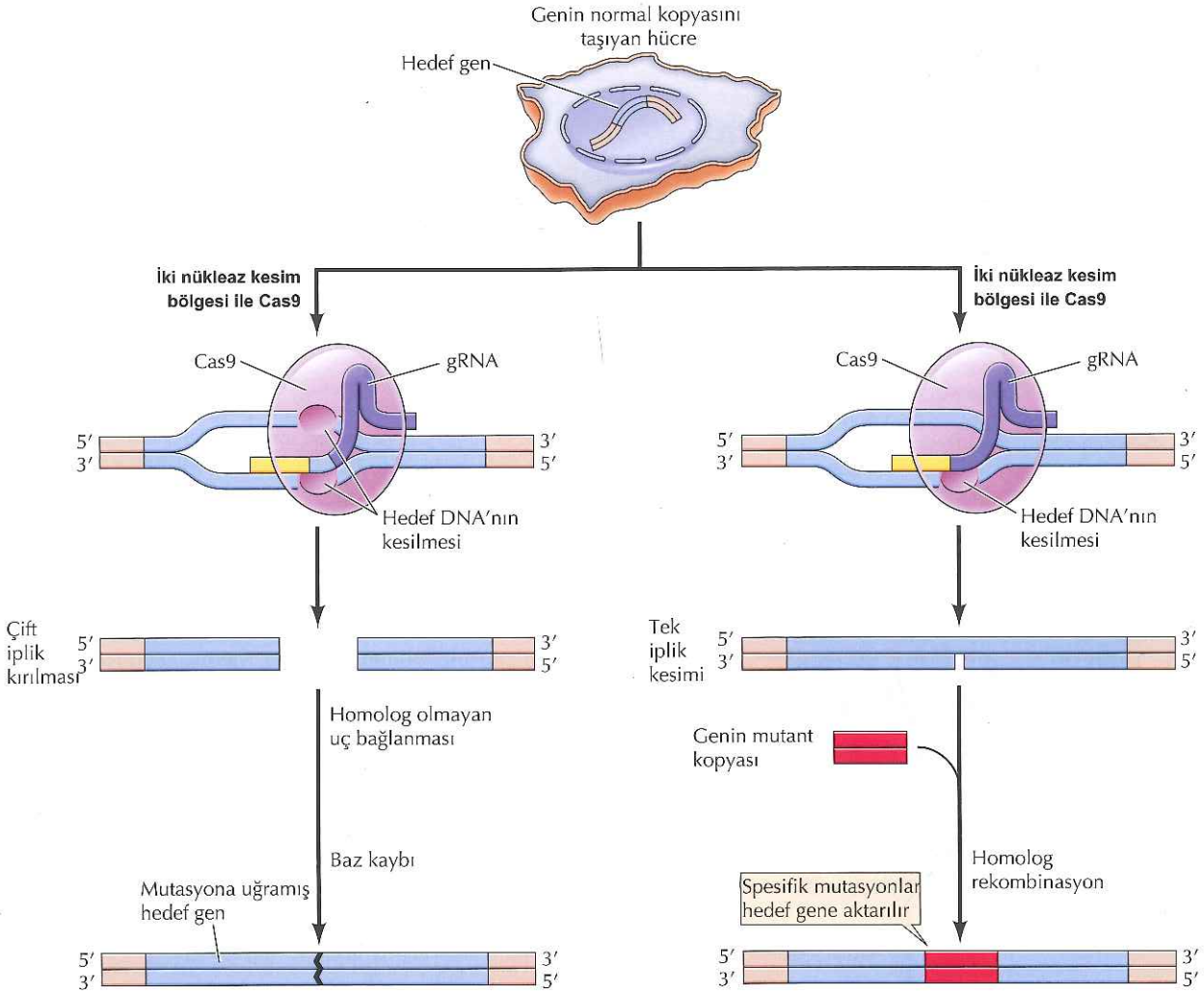
CRISPR/Cas sistemi ile genom mühendisliği

Homolog rekombinasyona dayalı geleneksel yöntemlerle hücresel genlerde mutasyon oluşturulması zor ve zaman alıcı olarak kalmıştır. Bu süreci kolaylaştırmak için, hücresel genomda istenilen diziyi spesifik olarak kesen hedefe özgü nükleazların kullanıldığı kolay ve etkin gen hedefleyen çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. İlk yöntemlerde rekombinant proteinler kullanılmıştır. İlk yöntemler, özel olarak dizayn edilen, yalnızca istenilen hedef gen içindeki 20-30 bazlık DNA dizilerini tanıyan ve bu DNA bağlanma bölgelerine nükleazların bağlandığı rekombinant proteinleri kullanıldı. Çok yakın bir geçmişte, özel hedef dizilerin bir protein yerine RNA molekülü tarafından tanındığı bir yöntem gelişirilmiştir. İstenilen herhangi bir diziye homolog RNA molekülleri kolaylıkla sentezlenebildiğinden, bu yaklaşım (**CRISPR/Cas sistemi** olarak adlandırılır) memeli hücrelerinde hedeflenen gen mutasyonunu oluşturmada kullanışlı ve etkindir.

CRISPR (*Clustered Regularly İnterspaced Alindromic Repeat*)/*Cas* (*CISPR-Associated Systems*), virüs ve plazmid gibi yabancı genetik yapılara karşı savunma mekanizması olarak bakterilerde keşfedilmiştir. CRISPR/Cas sistemleri, özel hedef dizileri tanıyan CRISPR RNA'ları ve hedef DNA'yı kesen Cas proteinlerinden oluşurlar. Sistem ilk defa 2013 yılında iki araştırma grubu trafından memeli hücrelerinde uygulanmıştır. Cas9 nükleazını ve hedef gene komplementer rehber RNA'yı (gRNA) eksprese eden plazmid memeli hücresine transfekte edilir. Rehber RNA Cas9 ile kompleks oluşturur ve Cas9'u hedef gene getirir (**Şekil 4.36**). Kullanılan Cas9 varyantına bağlı olarak, sistem DNA zincirlerinin her ikisini de keser ve çift zincir kırığı oluşturur veya yalnızca bir zinciri keserek bir zincir kırığı oluşturur. Eğer her iki zincir de kesilirse, çift zincir kırığı, kesilme bölgesinin onarımından sonra bölgede mutasyon oluşturma ihtimaline sahiptir. Bu durum sıklıkla hedef genin inaktivasyonuna neden olmaktadır. Yalnızca bir zincirin kırılması durumunda, eğer hücrede hedef bölge ile homolog olan DNA dizisi mevcut ise oluşan tek zıncır kırığı etkin rekombinasyonu teşvik eder. Böylelikle, rehber RNA ve Cas9 ile birlikte homolog rekombinasyon sonucu özel bir mutasyonun oldukça etkin bir şekilde hücreye aktarılması gerçekleştirilerek hedef genin mutant kopyası oluşturulur. Genetik mühendislikteki bu yaklaşım, istenilen mutasyonu taşıyan bir fareyi hızlı şekilde üretmemize imkan veren ES hücrelerini de içeren, kütüre edilen geniş çeşitlilikteki hücrelerde başarı ile kullanılmaktadır.

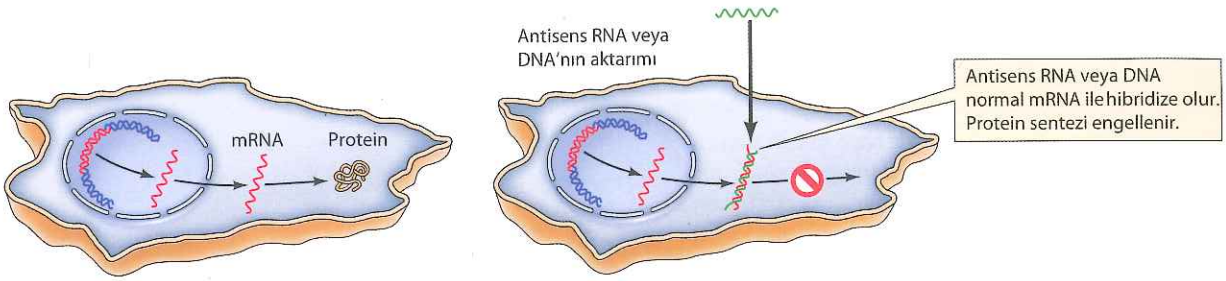
Hücresel gen ekspresyonunun engellenmesi

Homolog rekmbinasyon ile gen inaktivasyonuna alternatif olarak, gen ekspresyonunu veya fonksiyonunu spesifik olarak engelleyen çeşitli



Şekil 4.36 CRISPR/Cas ile gen hedefleme Hedef gen ile homolog bir rehber RNA (gRNA) ve Cas9 nükleaz eksprese eden plazmidler hücreye aktarılır. gRNA Cas9'u hedef gene yönlendirir. Cas9'un 2 varyantı kullanılmaktadır. Eğer Cas9 iki nükleaz kesim bölgesi içeriyorsa, hedef DNA'da çift iplikli kırık oluşturulur. Bu kırığın homolog olmayan rekombinasyon ile yeniden kapatılması hedef gende rastgele mutasyonların oluşmasına neden olur. Alternatif olarak, hücreye Cas9'un yalnızca bir nükleaz kesim bölgesi olan bir varyantı ile hedef genin mutasyona uğratılmış bir kopyası aktarılabilir. Bu durumda, Cas9 hedef DNA' nın yalnızca bir ipliğini keser ve böylece hedef gen ile mutant kopya arasında homolog rekombinasyona yol açar, bu da hedef gende spesifik bir mutasyon oluşması ile sonuçlanır.

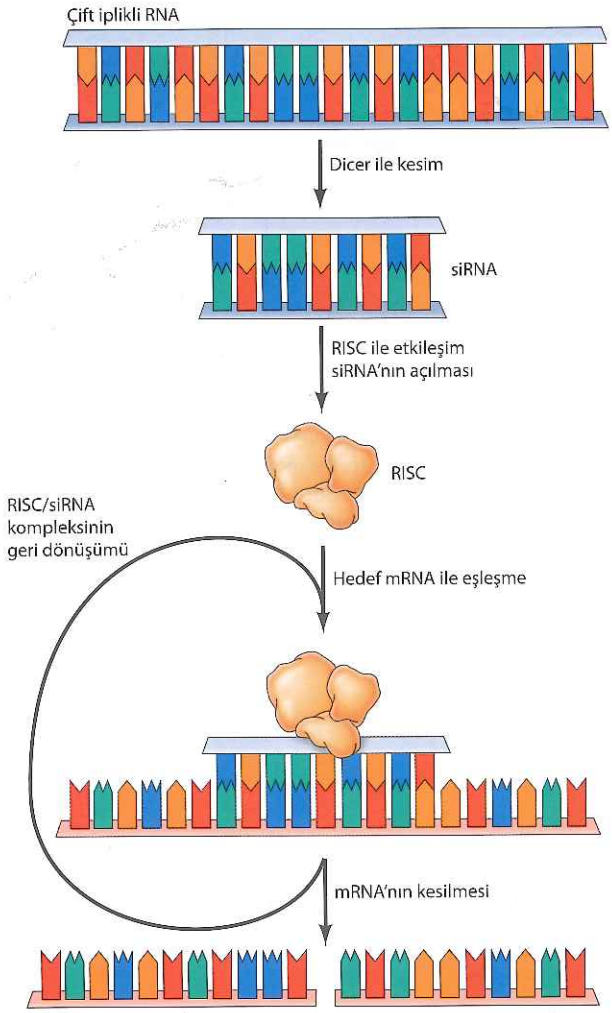
yaklaşımlar kullanılabilmektedir. İstenilen bir genin ekspresyonunu baskılamak için kullanılan yöntemlerden biri, kültüre edilen hücrelerin içine **antisens nükleik asit** yerleştirimesidir (Şekil 4.37). İlgilenen genin mRNA'sına komplementer olan RNA veya tek zincirli DNA (antisens), mRNA ile hibridize olur ve onun proteine çevrilmesini bloklar. Dahası, antisens DNA moleküllerinin yerleştirilmesi sonucu oluşan RNA-DNA hibridleri genellikle hücre içinde yıkılır. Antisens RNA'lar hücrelere doğrudan gönderilebilir veya entisens RNA eksprese etmek üzere geliştirimiş rekombinant vektörler ile hücreler transfekte edilebilir. Antisens DNA, ya hücreye transfekte edilir, ya da



Şekil 4.37 Gen ekspresyonunun antisens RNA veya DNA ile baskılanması Antisens RNA veya tek iplikli DNA, hedeflenen genin mRNA dizisine eşleniktir. Antisens nükleik asitler böylece hedef mRNA'ları ile hibrid oluşturur ve mRNA'dan protein sentezini durdurur ve mRNA yıkımına yol açar.

birçok durumda olduğu gibi, hücre tarafından doğrudan kültür ortamındaki besiyerinden alınan, genellikle kısa oligonükleotidler (yaklaşık 20 baz uzunluğunda) formundadır.

RNA interferens (RNAi), gen ekspresyonunun RNA seviyesinde susturulmasında son derece etkili ve yaygın kullanılan bir yöntem olarak yakın geçmişte ortaya çıkmıştır. RNA interferens ilk olarak 1998'de Andrew Fire, Craig Mello ve arkadaşlarının *C. elegans*'da çift iplikli RNA enjeksiyonunun, mRNA'sına komplementer olduğu genin ekspresyonunu baskıladığının bulunması ile keşfedildi. Bu beklenmedik gözlem, çift iplikli RNA'nın gen ekspresyonunun kontroldeki öngörülemeyen rolünü gösterdi ve sonrasında bu etki, hedef genlerin ekspresyonlarının baskılanmasında güçlü bir deneysel araç olarak geliştirildi. Çift iplikli RNA hücre içine yerleştirildiğinde, Dicer olarak adlandırılan enzim tarafından çift iplikli kısa moleküllere (21-23 nükleotid) kesilirler (**Şekil 4.38**). Kısa engelleyici RNA *(interfering RNAs*: siRNAs) olarak adlandırılan bu kısa çift iplikli moleküller, sonrasında RNA tarafından uyarılan sessizleştirme kompleksi (*RNA-induced silencing complex*: RISC) olarak adlandırılan protein kopleksi ile etkileşerler. Çift iplikli siRNA bu kompleksin içinde ayrışır ve mRNA'ya eşlenik olan iplik (antisens iplik), baz eşlemesi ile, kompleksin mRNA'ya hedeflenmesine rehberlik eder. Ardından, mRNA,



Şekil 4.38 RNA interferens Çift zincirli RNA molekülleri Dicer adı verilen bir enzimle kısa engelleyici RNA'lara (siRNA) kesilirler. Bu siRNA'lar RNA tarafından uyarılan sessizleştirme kompleksi (RNA-induced silencing complex: RISC) ile etkileşerek çözünürler. siRNA'nın antisens ipliği daha sonra RISC' in homolog olduğu mRNA'ya hedefler ve RISC kompleksinin bir alt birimi mRNA'yı keser. Bu RISC-siRNA kompleksi serbest kalır ve tekrar tekrar yeni RNA'ların yıkılması sürecine katılır.

RNA İnterferens

Potent and Specific Genetic Interference by Double Stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*

Andrew Fire, SiQun Xu, Mary K. Montgomery, Steven A. Kostas, Samuel E. Driver, and Craig C. Mello
Carnegie Institute of Washington, Baltimore, MD, and Univ. of Mass. Medical School, Worcester, MA
Nature, Volume 391, 1998, pages 806-811

Bağlam

Antisens RNA ilk olarak 1984 yılında keşfedildi ve ardından *C. elegans* gibi çeşitli hayvan modellerinde gen ekspresyonunu baskılamak için kullanıldı. Antisens RNA' nın hedef RNA (anlamalı) ile hibridize olarak, hedef RNA' nın translasyonunu baskıladığı düşünülmüştür. Ancak, bazı kontrol deneylerinin sonuçları bu etki mekanizması ile uyum göstermemiştir. Özellikle, Andrew Fire ve arkadaşları 1991' de hem anlamlı (sense) hem de karşı anlamlı (*anti-sense*) RNA' ları eksprese eden plazmidlerin *C. elegans* kas hücrelerinde gen ekspresyonunu etkilediğini gözlemlemişlerdir (*Development* 113: 503). Benzer şekilde, 1995 yılında, Su Guo ve Kenneth Kemphues hem anlamlı hem de karşı anlamlı RNA enjeksiyonunun erken embryonik gelişim için gerekli olan bir *C. elegans* geninin fonksiyonuna müdahele ettiğini gözlemlemişlerdir (*Cell* 81:611). Bu sonuçlar şaşırtıcıydı ve açıklanamadı, ancak anlamlı RNA' nın hedef RNA ile hibridize olması beklenmediğinden Fire, Craig Mello ve arkadaşları anlamlı RNA'nın beklenmeyen bu aktivitesinin nedenini araştırmaya karar verdiler ve bu 1998 makalesinde, RNA interferans fenomeninin çift iplikli RNA aracılığı ile olduğunu keşfettiler.

Deneyler

Anlamlı ya da karşı anlamlı RNA' ları üretmek için yapılan plazmidlerin az da olsa karşı iplikten de üretileceği beklenmekteydi, bu nedenle Fire, Mello ve arkadaşları küçük miktarda çift iplikli RNA' nın, hem anlamlı hem de karşı anlamlı RNA yapımında bulunabileceğini sorguladılar. Bu nedenle, çift iplikli RNA'nın gen ekspresyonunun inhibisyonuna katkı sağladığını düşündüler. Bunu test etmek için, hem anlamlı hem de karşı anlamlı tek iplikli RNA'lar ile çift iplikli RNA hibridlerinin çeşitli *C. elegans* genlerinin inhibitörleri olarak aktivitelerini karşılaştırdılar. Bütün koşullarda, çift iplikli RNA tek iplikli karşı anlamlı RNA'ya kıyasla gen fonksiyonunun çok daha etkili bir inhibitörü idi. Buna ek olarak, çift iplikli RNA enjeksiyonu hedef RNA' nın daha fazla yıkılmasına neden olurken, tek iplikli karşı anlamlı RNA en az düzeyde etkili oldu (bakınız şekil). Bu araştırıcılar bir kontrol deneyinden çıkan şaşırtıcı sonuçları takip ederek çift iplikli RNA'nın gen ekspresyonunu baskılamada etkili ve özel bir araç olduğunu keşfetmişlerdir.

Etki

RNA interferensin, bu şans eseri bulunuşu sadece gen fonksiyonunu baskılamada kullanılan yeni ve oldukça etkili bir deneysel metodun gelişimine katkıda bulunmamış, ayrıca ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonunun düzenlenmesini sağlayan mekanizmaları anlamamızda önemli bir değişikliğe neden olmuştur. Çift iplikli RNA' lar gerçekten de etkili bir deneysel araçtır ve günümüzde memeli hücreleri kültürünü de içeren çok sayıda deneysel sistemlerde de kullanılmaktadır. Daha da çarpıcı olan, çift-iplikli RNA' ların ökaryotik hücrelerde normal koşullardaki düzenleyici rollerinin daha fazla anlaşılmasını sağlamaktadır. 1998 yılındaki makalelerinde Fire ve Mello "RNA interferensin altında yatan mekanizmanın muhtemelen biyolojik bir amacı vardır, dsRNA (çift iplikli RNA) aracılı genetik interferens organizma tarafından fizyolojik gen susturması için kullanılıyor olabilir." diye tahminde bulunmuşturlar. İleri araştırmalar önemli oranda bu tahmini doğrulamıştır ve günümüzde çift iplikli RNA'lar tüm ökaryotlarda gen ekspresyonunun önemli düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır. Memelilerde yaklaşık 1000 tane kodlamayan küçük, çift iplikli düzenleyici RNA (mikroRNA olarak adlandırılır) tanımlanmış olup mikroRNA aracılı gen düzenlenmesinin hücre sinyal iletimi, hücre yaşaması, kalp ve beyin gelişimi ve kanser gibi pek çok hücresel olayda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Her bir mikroRNA'nın birden çok mRNA hedefi vardır ve insan genlerinin yarısından fazlasının mikroRNA' lar aracılığı ile düzenlendiği tahmin edilmektedir. Bir kontrol deneyinin beklenmeyen sonucu olarak RNA interferensin keşfedilmesi gen düzenlenmesinin anlaşılmasında köklü değişiklikler yapmıştır.

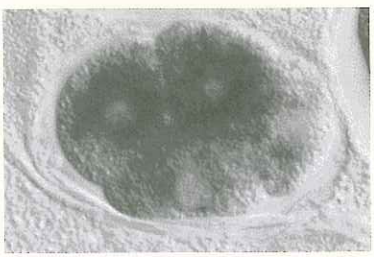
Andrew Fire

Craig Mello

Fire'ın Fotoğrafı: Linda A. Cicero Stanford Haber Servisi Mello'nun fotoğrafı Massachusetts Üniversitesi Tıp Fakültesi 'nin izniyle.

(A) Enjekte edilmeyen kontrol

(B) Karşı anlamlı RNA enjekte edilmiş



(C) Çift iplikli RNA enjekte edilmiş

C. elegans embriyolarına mex-3 mRNA'sına homolog ya antisens ya da çift iplikli RNA enjekte edildi. Daha sonra embriyolardaki mex-3 mRNA düzeyi in-situ hibridizasyon ile (koyu boyama ile gösterilmiştir) belirlendi. Antisens RNA' da bir etki saptanmazken, çift iplikli RNA'nın enjeksiyonu mex-3 hedef mRNA' sının tamamen kaybolması ile sonuçlandı.

Bilgi İçin

Antisens oligonükleotidler ve siRNA özellikle viral enfeksiyonların tedavisinde potansiyel terapötik ajan olarak araştırılmaktadır.

RISC proteinlerinden biri tarafından kesilerek parçalanır. RISC-siRNA kompleksi, mRNA'nın kesilerek yıkılmasını takiben serbest kalır ve tekrar tekrar mRNA'nın kesilerek parçalanmasına katılmaya devam ederek, hedef mRNA'nın etkin bir şekilde yıkılmasına öncülük eder.

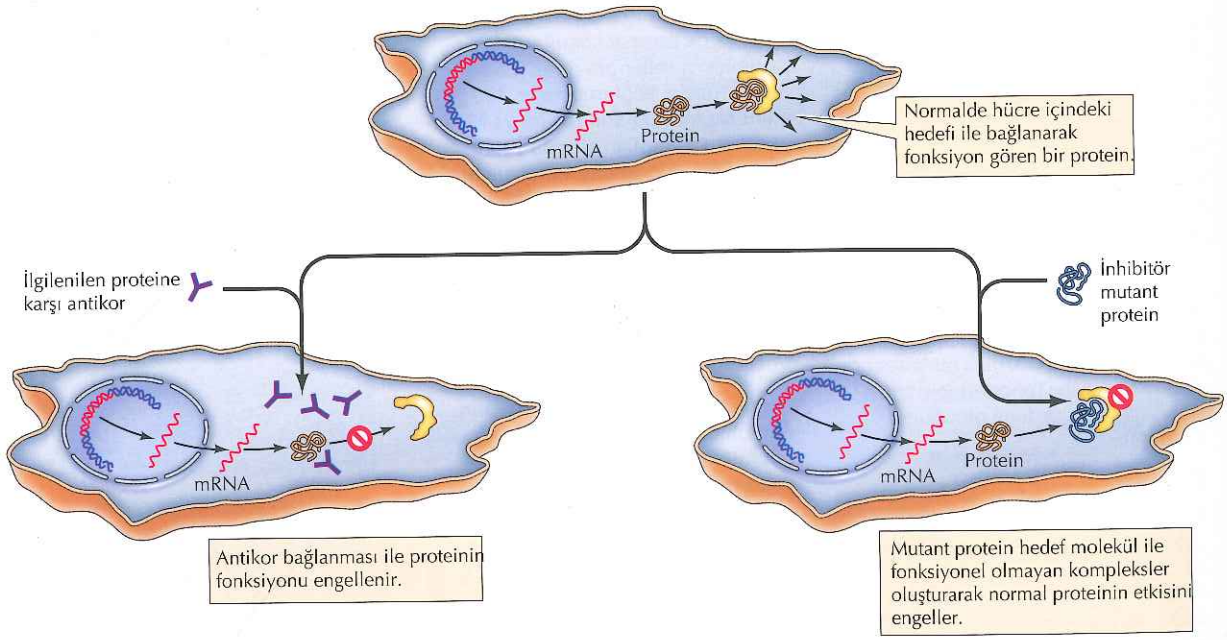
RNAi, dizilimi bilinen herhangi bir genin, gen ekspresyonunu baskılayarak, *C. elegans*, *Drosophila*, *Arabidopsis* ve memeli hücrelerinde fonksiyonunu araştırmak için oluşturulmuş oldukça güvenilir bir yaklaşımdır. Buna ek olarak, genomda geniş bir gen grubunu kapsayan çift iplikli RNA ve siRNA kütüphaneleri, hücre büyümesi veya hücre sağ kalımı gibi özgün biyolojik olaylarda rol alan yeni genleri tanımlamak için *C. elegans*, *Drosophila* ve insan hücrelerini taramada kullanılmaktadır. Son olarak, RNAi sadece deneysel bir araç değildir: bölüm 8 ve 9'da tartışılacağı gibi RNA interferens; gen ekspresyonunu transkripsiyonel ve translasyonel seviyede kontrol eden başlıca düzenleyici mekanizmalardan birisidir.

Video 4.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v4.1

RNA İnterferens RNA interferens (RNAi) küçük engelleyici (interfering) RNA (siRNA) ve mikroRNA (miRNA) aracılığı ile gen aktivitesini düzenleyen önemli bir işlemdir.

Bir genin inaktivasyonu veya bir mRNA'nın yıkılmasının uyarılmasına ek olarak, bazen, hücre içi proteinlerin işlevinin engellenmesi de mümkün olmaktadır (**Şekil 4.39**). Bir uygulama, antikorların mikroenjeksiyonu ile, bu antikorun tanıdığı proteinin aktivitesinin engllenmesidir. Alternatif olarak, bazı mutant proteinler aynı hücre içinde eksprese edildikleri zaman, karşılıkları olan normal proteinlerin işlevlerini engelleyebilirler – örneğin mutant ve normal proteinlerin aynı hedef moleküle bağlanmak için yarışmaları gibi. Bu gibi mutant proteinleri kodlayan DNA'lar klonlanarak (**dominant inhibitör** veya **dominant negatif mutantlar** olarak adlandırılır) gen transferi yolu ile hücreye aktarılabilir ve normal gen işlevini durdurabilir.



Şekil 4.39 Protein işlevinin doğrudan engellenmesi Mikroenjeksiyon yolu ile aktarılan antikorlar hücredeki proteinlere bağlanır ve proteinlerin normal fonksiyonlarını durdurabilirler. Buna ek olarak bazı mutant proteinler de, normal proteinin fonksiyonunu engeller–örneğin, normal proteinin hedef moleküllere bağlanması aşamasında rekabete girerek.

ÖZET

Kalıtım, Genler ve DNA

- ***Genler ve kromozomlar:*** Kromozomlar genlerin taşıyıcısıdır.
- ***Genler ve enzimler:*** Genler proteinlerin amino asit dizisini belirler.
- ***DNA'nın genetik materyal olduğunun belirlenmesi:*** DNA'nın genetik materyal olduğu bakteri transformasyonu deneyleri ile anlaşılmıştır. Bkz. **Animasyonlar 4.1** ve **4.2**
- ***DNA'nın yapısı:*** DNA, karşılıklı ipliklere yerleşik pürin ve pirimidinler arasındaki hidrojen bağları ile birbirine tutunmuş, bir çift sarmaldır. A ileT ve G ile C bazları arasındaki özgün baz eşleşmeleriyle iki iplik birbirini tamamlar.
- ***DNA'nın replikasyonu:*** DNA, yarı korunumlu replikasyon ile kendini eşler, bunun için iki ipliği birbirinden ayrılır ve her iki iplik de yeni yavru ipliklerin sentezlenmesi için kalıp olarak işlev görür.

Genetik Bilginin Ekspresyonu

- ***Genler ile proteinler arasında doğrusal ilişki:*** DNA'daki nükleotidlerin sıralanma düzeni, proteinleri oluşturan amino asitlerin sırasını belirler.
- ***Mesajcı RNA'nın rolü:*** Mesajcı RNA, protein sentezi için kalıp görevi görerek DNA'daki bilginin ribozomlara iletilmesinde aracı olarak rol oynar.
- ***Genetik kod:*** Taşıyıcı RNA'lar, translasyon sırasında amino asitler ile mRNA'lar arasında adaptör olarak görev yapar. Her bir amino asit üç nükleotidden oluşan kodonlar tarafından belirlenir. Bkz. **Animasyonlar 4.3** ve **4.4.**
- ***RNA virüsleri ve ters transkripsiyon:*** DNA, ilk kez retrovirüslerde saptandığı gibi, RNA kalıbından sentezlenebilir. Bkz. **Animasyon 4.5.**

Rekombinant DNA

- ***Restriksiyon endonükleazlar:*** Restriksiyon endonükleazlar, DNA molekülünü özgün DNA dizilerden tanıyıp, parçacıklar elde edilecek şekilde keserler. Bkz. **Animasyon 4.6.**
- ***Rekombinant DNA moleküllerinin oluşturulması:*** Rekombinant DNA molekülleri, uygun bir konakçı hücre içinde bağımsız olarak replike olabilen bir vektör ve bu vektöre yüklenmiş ilgilenilen DNA barçası eklentisinden oluşur. Bkz. **Animasyon 4.7.**
- ***Rekombinant DNA vektörleri:*** Farklı büyüklükteki DNA parçalarının klonlanmasında birçok farklı vektör kullanılır.
- ***DNA dizi analizi:*** Klonlanmış DNA parçacıklarının nükleotid dizileri kolaylıkla belirlenebilir. Bkz. **Animasyon 4.8.**
- ***Klonlanmış genlerin ekspresyonu:*** Klonlanmış genler tarafından kodlanan proteinler bakteri veya ökaryot hücrelerinde yüksek oranda eksprese ettirilebilir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

gen, allel, baskın, çekinik, genotip, fenotip, kromozom, diploid, mayoz, haploid, mutasyon

transformasyon

yarı korunumlu replikasyon, DNA polimeraz

ana dogma, transkripsiyon, translasyon, mesajcı RNA (mRNA), RNA polimaraz, ribozomal RNA (rRNA), taşıyıcı RNA (tRNA)

genetik kod, *in vitro* translasyon, kodon

retrovirüs, ters transkripsiyon, revers transkriptaz

restriksiyon endonükleaz, jel elektroforezi, kesim haritası

moleküler klonlama, vektör, rekombinant molekül, moleküler klon, plazmid, DNA ligaz, cDNA

replikasyon orijini, kozmid, P1 yapay kromozomu (PAC) bakteri yapay kromozomu (BAC) maya yapay kromozomu (YAC)

dideoksinükleotid yeni nesil gen dizilimi

ekspresyon vektörleri

ÖZET

Nükleik Asitlerin ve Proteinlerin Saptanması

- ***DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu:*** PCR, DNA'nın seçilen bölümlerinin *in vitro* izolasyonunu ve amplifikasyonunu sağlayarak küçük miktarlardaki DNA veya RNA moleküllerinin saptanmasında hasas bir yöntem sunmaktadır. Bkz. **Animasyon 4.9.**

polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), gerçek zamanlı (*real-time*) PCR

- ***Nükleik asit hibridizasyonu:*** Nükleik asit hibridizasyonu, özgün DNA ve RNA dizinlerinin, eşlenik oldukları ipliklerle yaptıkları baz eşleşmesi ile saptanmasını sağlar. Bkz. **Animasyonlar 4.10-4.12.**

nükleik asid hibridizasyonu, Southern blotlama, Northern blotlama, rekombinant DNA kütüphanesi, *in situ* hibridizasyon

- ***Protein probları olarak antikorlar:*** Antikorlar, hücrelerde veya hücre özütlerindeki özgün proteinlerin saptanmasında kullanılırlar. Bkz.**Animasyon 4.13.**

antikor, antijen, monoklonal antikor, immünblotlama, Western blotlama, SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Ökaryotlarda Gen Fonksiyonu

- ***Bitkilerde ve hayvanlarda gen aktarımı:*** Klonlanmış genler, fonksiyonel analizleri için karmaşık yapıdaki ökaryotik hücrelere ve çok hücreli organizmalara aktarılabilir.

gen transferi, transfeksiyon, lipozom, elektroporasyon, geçici ekspresyon, transgenik fareler, embriyonik kök hücre

- ***Klonlanmış DNA'larda mutasyon oluşturma:*** Klonlanmış DNA'larda *in vitro* mutasyon oluşturulması, oluşturulan mutasyonun gen fonksiyonu üzerine etkisini çalışmada kullanılır.

***in vitro* mutagenez**

- ***Hücresel genlerde mutasyon oluşturma:*** Klonlanmış DNA dizilerinin homolog rekombinasyonu ile kromozomal gen kopyalarında mutasyon oluşturulabilir.

homolog rekombinasyon, knockout

- ***CRISPR/Cas sistemi ile genom mühendilik:*** İstenilen genin mutasyonunun veya homolog rekombinasyonunun hedeflenmesi için CRISPR/Cas sistemi etkin bir şekilde kullanılabilir.

CRISPR/Cas sistemi

- ***Hücresel gen ekspresyonunun engellenmesi:*** Spesifik genlerin ekspresyonu veya fonksiyonu antisens nükleik asitler, RNA interferens, veya dominant baskılayıcı mutantlar ile bloklanabilir. Bkz. **Video 4.1.**

antisens nükleik asit, RNA interferens (RNAi), dominant inhibitor mutant, dominant negatif mutant

ANAHTAR SÖZCÜKLER

Atıf

Hücre
Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Sorular

1. *Drosophila*'da iki farklı genin bağlı olup olmadığını nasıl belirlersiniz?
2. *E. coli*'yi birkaç kuşaktan beri ^{15}N içeren besi ortamında büyütüyorsunuz. Ardından hücreler ^{14}N içeren besiyerine transfer ediliyorlar ve iki ilave kuşak daha çoğaltılıyorlar. Bu hücrelerden elde edilen DNA ne oranda ağır, hafif ve orta ağırlıkta olur?
3. Bir genin kodlayan bölgesine bir ya da iki nükleotidin eklenmesi veya çıkartılması fonksiyon göremeyen bir protein üretirken, üç nükleotidin birden eklenmesi ya da çıkartılması sıklıkla hemen hemen normal fonksiyon gören bir protein üretir. Açıklayın.
4. *Eco*RI ile kesilmiş insan DNA'sını klonlamak için kullanılacak olan bir yapay maya kromozomunun sahip olmak zorunda olduğu özellikleri tarif edin.
5. Aktif bölgesinde UGU üçlüsü tarafından kodlanan bir sistein kalıntısı

bulunan bir enzim ile çalışıyorsunuz. Üçüncü bazın C'ye dönüşmesi enzim fonksiyonunu nasıl bozar? A'ya dönüştüren bir mutasyon oluşursa ne olur?

6. Bir 4 kb'lık DNA molekülü *Eco*RI enzimi ile kesildiğinde, 1 kb ve 3 kb uzunluğunda iki parçaya ayrılır. Aynı molekülün *Hind*III ile kesilmesi ise 1.5 kb ve 2.5 kb uzunluğunda parçalar verir. Son olarak, *Eco*RI ve *Hind*III'ün her ikisinin birden kullanılmasında ise 0.5 kb, 1 kb ve 2.5 kb büyüklüğünde parçalar elde edilir. *Eco*RI ve *Hind*III kesim bölgelerinin pozisyonlarını gösteren bir kesim bölgesi haritası çiziniz.
7. Tek bir spermden elde edilen DNA ile başladığımızda 10 PCR döngüsü sonunda özgün bir genden kaç kopya elde edilebilir? 30 döngü sonunda ne olur?
8. Bir insan genomik DNA parçasını cosmid vekörüne klonladınız; eklenti olan DNA'nın *Bam*HI kesim enzimi ile yaklaşık olarak kaç kere kesilmesini beklersiniz?
9. İnsan DNA'sından genomik kütüphane oluşturmak için ihtiyaç duyulan minimum sayıdaki BAC klonu nedir?
10. Aktinomisin D'nin influenza vürüs replikasyonunu nasıl etkilemesini beklersiniz?
11. Kalıcı olarak transfekte olmuş memeli hücrelerini izole etmenize olanak sağlayacak klonlama vektörünün kritik özelliği nedir?
12. Nükleik asitler net negatif yüke sahiptirler ve büyüklüklerine göre jel elektroforezinde ayrıştırılabilirler. Buna karşın, farklı proteinler farklı yüklere sahiptirler. Proteinler boyutlarına göre elektroforez ile nasıl ayrılabilirler?
13. CRISPR/ Cas sistemi hedeflenen gende homolog rekombinasyon etkinliğini nasıl arttırmaktadır?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar (Her ana bölüm için en önemli derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Kalıtım, Genler ve DNA

Avery, O. T., C. M. MacLeod and M. McCarty. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 79: 137-158. [P]

Franklin, R. E. and R. G. Gosling. 1953. Molecular configuration insodium thymonucleate. *Nature* 171: 740-741. [P]

Kornberg, A. 1960. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science* 131: 1503-1508. [P]

Kresge, N., R. D. Simoni and R. L. Hill. 2005. Launching the age of biochemical genetics with *Neurospora:* The work of George Wells Beadle. *J. Biol. Chem.* 280: e9-e11. [R]

Lehman, I. R. 2003. Discovery of DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 278: 34733- 34738. [R]

Meselson, M. and F. W. Stahl. 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44: 671-682. [P]

Watson, J. D. and F. H. C. Crick. 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171: 964-967. [P]

Watson, J. D. and F. H. C. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738. [P]

Wilkins, M. H. F., A. R. Stokes and H. R. Wilson. 1953. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature* 171: 738-740 . [P]

Genetik Bilginin İfadesi

Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226: 1209-1211. [P]

Brenner, S., F. Jacob and M. Meselson. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190: 576-581. [P]

Crick, F. H. C., L. Barnett, S. Brenner and R. J. Watts-Tobin. 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192: 1227-1232. [P]

Ingram, V. M. 1957. Gene mutations in human hemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin. *Nature* 180: 326-328. [P]

Nirenberg, M. 2004. Historical review: Deciphering the genetic code—a personal account. *Trends Biochem. Sci.* 29: 46-54. [R]

Nirenberg, M. and P. Leder. 1964. RNA codewords and protein synthesis. *Science* 145: 1399-1407. [P]

Nirenberg, M. W. and J. H. Matthaei. 1961. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 1588-1602. [P]

Temin, H. M. and S. Mizutani. 1970. RNA dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226: 1211-1213. [P]

Yanofsky, C. 2007. Establishing the triplet nature of the genetic code. *Cell* 128: 815-818. [R]

Rekombinant DNA

Burke, D. T., G. F. Carle and M. V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806-812. [P]

Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, H. W. Boyer and R. B. Helling. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 70: 3240-3244. [P]

Green, M. R. and J. Sambrook. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 4th ed . Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Na thans, D. and H. O. Smith. 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 44: 273-293. [R]

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467. [P]

Nükleik Asitlerin ve Proteinlerin Saptanması

Ausubel, F. M. ed. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology* . New York: J. Wiley and Sons.

Caruthers, M. H. 1985. Gene synthesis machines: DNA chemistry and itsuses. *Science* 230: 281-285. [R]

Grunstein, M. and D. S. Hogness. 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3961-3965. [P]

Harlow, E. and D. Lane. 1999. *Using Antibodies*: *A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kohler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497. [P]

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermos table DNA polymerase. *Science* 239: 487-491. [P]

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 98: 503-517. [P]

Ökaryotlarda Gen Fonksiyonu

Branda, C. S. and S. M. Dymecki. 2004. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Devel. Cell* 6: 7-28. [R]

Bronson, S. K. and O. Smithies. 1994. Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 269: 27155-27158. [R]

Capecchi, M . R. 2005. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Rev. Genet.* 6: 507-512. [R]

Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini and F. Zhang. 2013. Multiplex genome engineer ing using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819-823. [P]

Doudna, J. A. and E. Charpentier. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346: 1258096. [R]

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811. [P]

Herskowitz, I. 1987. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 329: 219-222. [R]

Hsu, P. D., E. S. Lander and F. Zhang. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell 157:* 1262-1278. [R]

Izant, J. G. and H. Weintraub. 1984. Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: A molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36: 1007-1015. [P]

Kim, H. and J.-S. Kim. 2014. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Rev. Genet.* 15: 321-334. [R]

Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet and K. Rajewsky. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427-1429. [P]

Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville and G. M. Church. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339: 823-826. [P]

Mello, C. C. and D. Conte Jr. 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431: 338-342. [R]

Nilsen, T. W. 2007. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet.* 23: 243-249. [R]

Novina, C. D. and P. A. Sharp. 2004. The RNAi revolution. *Nature* 430: 161-164. [R]

Palmiter, R. D. and R. L. Brinster. 1986. Germ-line transformation of mice. *Ann. Rev. Genet.* 20: 465-499 . [R]

Sampson, T. R. and D. S. Weiss. 2013. Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology. *Bioessays* 36: 34-38. [R]

Smith, M. 1985. *In vitro* mutagenesis. *Ann. Rev. Genet.* 19: 423-462. [R]

BÖLÜM 5

Genomik, Proteomik ve Sistem Biyolojisi

Genomlar ve Transkriptomlar 157

Proteomik 167

Sistem Biyolojisi 173

Ananahtar Deney
İnsan Genomu 161

Moleküler Tıp
Sıtma ve Sentetik Biyoloji 180

Geçtiğimiz yıllar, geniş ölçekli deneysel ve hesaplamalı yaklaşımların biyolojik sistemlerin karmaşıklığının anlaşılması için uygulanmasıyla, bilim insanlarının hücre ve moleküler biyolojiye yaklaşımlarında kapsamlı değişikliklere tanık olmuştur. Hücre ve moleküler biyologlar, geleneksel olarak, birkaç gen veya protein üzerine çalışmalar yapmıştır. Biyolojik sistemlerin çalışılması bağlamında yüksek miktarda veri üreten, büyük ölçekli deneysel yaklaşımların geliştirilmesiyle, genom dizileme projelerinde bu durum değişmiştir. İnsan örnekleri de dahil olmak üzere, pekçok farklı organizmanın tüm genom dizileri, hücre ve moleküler biyoloji çalışmalarında yeni bir çerçeve oluşturmakta ve tıbbi pratikte yeni olanaklar ortaya koymaktadır. Sadece tüm genom dizileri elde edilip, analiz edilmemekte, aynı zamanda bu yöntemler sayesinde, hücrelerde ifade edilen bütün RNA ve proteinlerin büyük ölçekte analizi gerçekleştirilebilmektedir. Bu tarz global deneysel yaklaşımlar, yeni bir alan olan ve karmaşık biyolojik sistemlerin kantitatif olarak anlaşılmasını içeren, sistem biyolojisi alanının temelini oluşturmaktadır. Bu bölüm, bu tarz yeni yöntemlerin gelişimi ve hücre moleküler biyolojisinin anlaşılmasındaki etkilerini gözönünde bulundurmaktadır.

Genom ve Transkriptomlar

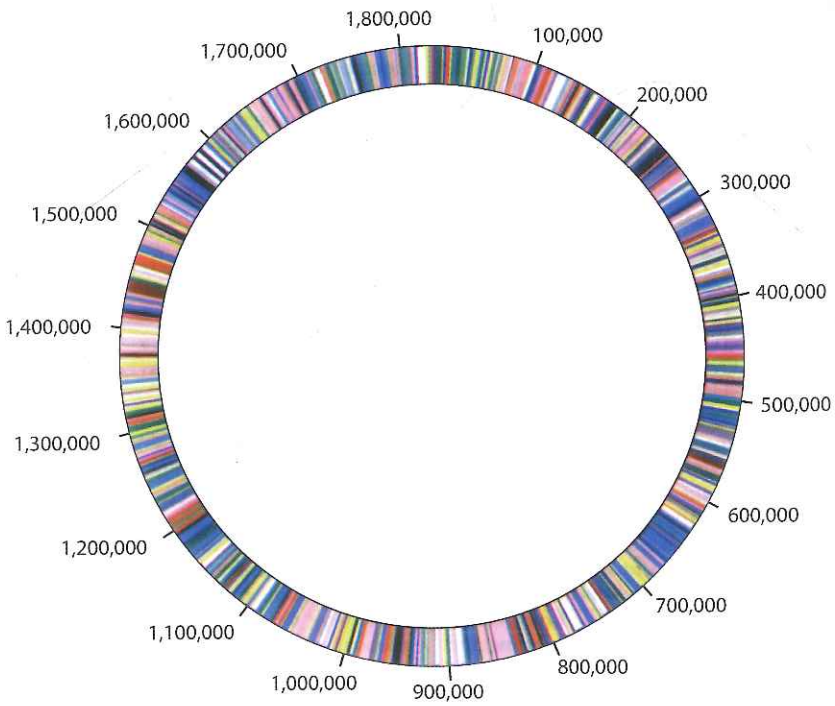
İnsan genom diziliminin elde edilmesi, yaşam bilimlerinde gerçekleştirilmiş ilk büyük ölçekli deneysel projedir. Seksenli yıllarda ilk kez başlatıldığında, insan genomunda var olan 3 milyar baz çiftinin dizilenmesi düşüncesi, ürkütücü bir iş olarak görünüyordu. Hepsinden daha önemlisi, o ana dek dizilenmiş en büyük genom, 200,000'den daha az bazı olan bir viral genomdu. İnsan Genom Projesi (Human Genome Project), biyolojideki en geniş katılımlı çalışma haline geldi ve insan genom dizi sonuçları, önce taslak olarak 2001 yılında, daha sonra rafine edilmiş bir halde 2004 yılında yayınlandı. Bu süreçte, genom evrimine ışık tutan, pekçok başka türe ait genom dizileri de elde edilmiştir. Dahası, DNA dizileme teknolojilerinde devasa ilerlelemeler kaydedilmiş olup, yeni dizileme yöntemleri, bireysel genom veya RNA'nın hızlı ve ekonomik bir şekilde dizilenmesine izin vermektedir. Bu ilerlemeler, bilim insanlarının, genom yapısı ve işleviyle ilgili bakış açılarını değiştirmekle kalmayıp, hastalık tanı ve tedavisinde kişisel genom dizilemeye dayanan yeni yaklaşımlara izin vermiştir.

Bakteri ve maya genomları

İlk dizilenen hücresel genom, 1995 yılında Craig Venter tarafından yönetilen bir araştırma grubu tarafından rapor edilmiş olup, insan solunum yollarında

yaygın olarak bulunan *Haemophilus influenzae* isimli bir bakteri türüne aittir. *H. influenzae* türünün genomu dairesel bir molekül olup, insan genomundan 1000 kattan daha küçüktür ve yaklaşık 1.8×10^6 baz çifti barındırmaktadır. Tüm DNA dizisi elde edildiği zaman, rRNA, tRNA ve protein kodlayan genlerin dizileri analiz edilmiştir. DNA dizisindeki **açık okuma çerçevelerinin (open reading frames)** belirlenmesi için uygulanan bilgisayar analizleri sayesinde protein kodlama potansiyeli olan bölgeler keşfedilmiştir. Açık-okuma çerçeveleri, zincir sonlandıran üç kodonun (UAA, UAG, ve UGA) hiçbirini barındırmadığından, polipeptit kodlayabilen, uzun nükleotid dizilimlerine verilen addır. Bu dizi-sonlandıran kodonlar, rastgele her 21 kodonda (64 toplam kodonun üçü dizi sonlandıran kodondur) bir bulunduğundan 100 kodondan daha uzun olan açık-okuma çerçeveleri işlevsel genleri temsil ederler. Bu analiz sonucunda, altı kopya rRNA geni ve 54 farklı tRNA geninin yanısıra, *H. influenzae*'de 1743 potansiyel protein kodlayan bölge tespit edilmiştir (**Şekil 5.1**). Tahmin edilen kodlama dizileri, ortalama 900 baz çifti olup; *H. influenzae* genomunun yaklaşık % 90'ına karşılık gelen, 1.6 Mb DNA kadar bir alana karşılık gelmektedir. *E. coli* 'nin genomu, *H. influenzae*'nınkinin yaklaşık iki katı olup, 5.6×10^6 baz çifti uzunluğundadır ve yaklaşık 4200 gen içermektedir. Yine, DNA'nın yaklaşık %90'ı protein-kodlayan dizi olarak kullanılır. 2000 adetten daha çoğu dizilenmiş olan bakterilerde, nerdeyse bütün DNA'nın protein kodlama amacıyla kullanılması bakteri genomlarının tipik bir özelliğidir.

Bir model olarak kullanılabilecek basit bir ökaryotik genom, 1996 yılında dizilenen ve bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'da bulunmuştur. Birinci bölümde tartışıldığı gibi, maya ökaryotik hücrelerin bütün özelliklerini taşıyan basit bir tek hücreli organizmalardır. *Saccharomyces cerevisiae*'nın



Şekil 5.1 ***Haemophilus influenzae* genomu** Protein kodladığı tahmin edilen bölgeler renkli çubuklarla belirtilmiştir. Sayılar DNA baz çiftlerini göstermektedir. (R. D. Fleischmann'dan alınmıştır,1995 *Science* 169: 496.)

genom boyutu *E. coli*'ninkinin yaklaşık 2.5 katı olup, 12 x 10^6 adet baz çiftinden oluşmaktadır ve 6000 civarında protein kodlayan gen barındırmaktadır. Bu sebeple, ökaryotik hücreler daha karmaşık oldukları halde, mayalar, *E. coli*'ye kıyasla sadece %50 civarında daha fazla gene sahiptir. Bütün maya DNA'sının %70'i protein kodlayan dizilerden oluşmaktadır; dolayısıyla, maya, bakteride olduğu gibi yüksek yoğunlukta protein kodlayan dizilere sahiptir.

Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster ve Arabidopsis thaliana genomları

Genomikteki bir sonraki önemli gelişme, göreceli olarak daha basit çok hücreli organizmalar olan *C. elegans*, *Drosophila*, ve *Arabidopsis*'in genomlarının dizilenmesi olmuştur. Bu organizmaların ayırtedici özellikleri onları genom analizinde önemli model organizmalar olarak ortaya koymaktadır: *C. elegans* ve *Drosophila* hayvan gelişimi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır, ve özellikle *Drosophila* genetik olarak iyi analiz edilmiştir. Benzer bir şekilde, *Arabidopsis*, bitki moleküler biyolojisi ve gelişimi çalışmalarında model olarak kullanılmaktadır. Bu üç organizmanın her birinin genom boyutu yaklaşık olarak 100 x 10^6 baz çifti olup; maya genomundan yaklaşık olarak 10 kat büyüktür; ancak insan genomundan 30 kat küçüktür. 1998 yılında *C. elegans*'ın, 2000 yılında *Drosophila* ve *Arabidopsis*'in tüm genom dizilerinin belirlenmesi, genom dizileme yaklaşımının kullanımını tek hücreli bakteri ve mayadan sonra çok hücreli organizmalara doğru genişletilmesinde en önemli gelişme olmuştur.

Video 5.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v5.1
***C. elegans*'ın Kısa Tanıtımı**
C. elegans moleküler biyoloji ve gelişim biyolojisi çalışmalarında kullanılan önemli bir model organizmadır.

Bu genom dizilemelerinin beklenmedik sonuçlarından biri, bakteri ve maya genomlarına kıyasla, beklenenden daha az sayıda protein kodlayan geni içerdiklerinin tespitiydi (Tablo 5.1). *C. elegans* genomu 97 x 10^6 baz çifti olup, yaklaşık 19,000 protein kodlayan gen içerdiği tahmin edilmektedir. Dolayısıyla, mayaya göre yaklaşık sekiz kat daha büyük DNA'ya karşılık

Tablo 5.1 Temsilci Genomlar

Organizma	Genom boyutu (Mb)[a]	Protein kodlayan genlerin sayısı	Protein kodlayan dizi
Bakteri			
H. influenza	1.8	1700	%90
E. coli	4.6	4200	%88
Mayalar			
S. cerevisiae	12	6000	%70
Omurgasızlar			
C. elegans	97	19,000	%25
Drosophila	180	14,000	%10
Bitkiler			
Arabidopsis thaliana	125	26,000	%25
Memeliler			
İnsan	3000	21,000	%1.2

[a]Mb = milyon baz çifti

Bilgi İçin

Bugüne kadar en fazla sayıda gene sahip olarak bilinen organizma, insan genomunda bulunan gen sayısının iki katından fazla gen barındıran elmadır (Bkz. Bölüm 6).

gelmekle birlikte, toplam gen sayısının sadece üç katı kadardır. *Drosophila* genomu 2000 yılında dizilendiğinde, sadece 14,000 protein-kodlayan gene sahip olduğunun görülmesi şaşırtıcı olmuştur. Bu sayı, *Drosophila*'nın daha kompleks bir organizma olduğu düşünüldüğünde, *C. elegans*'taki gen sayısından çok daha küçüktür. Daha da ilginci, *Drosophila* gibi karmaşık bir organizmanın gen sayısının, mayada bulunanın yalnızca iki katından biraz daha fazla olmasıdır. Protein kodlayan diziler *Drosophila* genomunun yalnızca yaklaşık %10'una ve *C. elegans* genomunun %25'ine karşılık gelmekte olup, maya genomunun %70'ininkiyle karşılaştırıldığında, *Drosophila* ve *C. elegans* genomlarının daha büyük olması, protein kodlayan genlerden ziyade, protein kodlamayan dizilerden oluşması yüzündendir.

2000 yılında *Arabidopsis thaliana*'nın genom dizilemesinin tamamlanması, genom dizileme işleminin hayvanlardan bitkilere de uzanmasını sağladı. Yaklaşık 125 x 10^6 baz çifti DNA'dan oluşan *Arabidosis* genomu, yaklaşık 26,000 protein kodlayan gen içermekte olup, bu sayı *C. elegans* veya *Drosophila*'da bulunandan çok daha fazladır. Daha sonraları diğer bitki genomlarında daha fazla gen bulunmuştur. Örneğin, elma genomu 57,000 protein kodlayan gen içermekle, gen sayısı ve organizma karmaşıklığı arasında bir ilişki olmadığını vurgulamaktadır.

İnsan genomu

Pekçok bilim insanı için, insan genom projesinin asıl hedefi, insan genomundaki tüm nükleotid diziliminin belirlenmesiydi: yaklaşık 3x10^9 DNA baz çifti. Çok büyük olması nedeniyle, insan genom dizisinin belirlenmesi ve 2001 yılında taslak olarak yayınlanması, tarihi öneme sahip bir başarıdır.

2001 yılında taslak olarak yayınlanan insan genomu dizisi, farklı yaklaşımlar kullanan iki bağımsız araştırma grubu tarafından üretilmiştir. Bu dizilerin her ikisinde de, insan genomu % 90 oranında dizilenmiş ve birleştirilmiş halde olup tamamlanmamış taslak halindeydiler. Sürekli uğraşlar neticesinde boşluklar doldurulmuş, taslak dizinin doğruluğu arttırılmış bir biçimde ve yüksek kalitede insan genom dizisi, 2004 yılında Uluslararası İnsan Genom Dizileme Konsorsiyum'u tarafından yayın haline dönüştürülmüştür.

Bilgi İçin

Uzun yıllar boyunca bilim insanları tahmini olarak insan genomunda 100,000 civarında gen olduğunu varsayımını kabul etti. 2001 yılında taslak genomun yayınlanmasıyla birlikte, bu sayı dramatik bir şekilde 30,000-40,000 arasına indirildi. 2004 yılında yayınlanan yüksek kalitede dizi ve genlerin belirlenmesinde gelişmiş hesaplamalı araçların kullanılmasıyla birlikte, protein kodlayan insan genlerin sayısı güncel tahminlerde –yaklaşık 21,000 olacak şekilde- daha da düşmüştür (Bkz. Bölüm 6).

Genom dizisinde tahmin edilenden düşük sayıda gen bulunması büyük bir sürpriz olmuştur (bkz. Tablo 5.1). İnsan genomunun, daha basit organizmalar olan *C. elegans* ve *Drosophila*'nınkinden çok daha fazla olmayan ve *Arabidopsis* ve diğer bitkilerden daha az olan, sadece 21,000 civarında protein kodlayan gene sahip olduğu anlaşılmıştır. Bakteri ve mayada protein kodlayan diziler genomun çoğuna, *Drosophila* ve *C. elegans*'da da %10-25'lik kısmına karşılık gelmekle beraber, insan genomunun sadece yaklaşık %1'ine karşılık gelmektedirler. İnsan genomundaki ilave dizilerin doğası ve gen regülasyonundaki rollerinin, biyolojik kompleksliğe gen sayısından daha fazla katkı sağlayabileceği bir sonraki bölümde tartışılacaktır.

Tahmin edilen insan proteinlerinin % 40'ından çoğu, dizilenmiş olan maya, *Drosophila* ve *C. elegans* gibi daha basit organizmalardaki proteinlerle ilişkilidir. Korunmuş olan proteinlerin çoğu, metabolizma, DNA replikasyonu ve tamiri, transkripsiyon, translasyon ve protein trafiği gibi temel hücresel işlemlerde görev almaktadır. İnsanlara özgü bu proteinlerin çoğu, diğer organizmalarda da bulunan protein domainlerinden oluşmuştur; ancak insanlarda bu domainler farklı proteinler oluşturacak biçimde özgün kombinasyonlarla bir araya

Anahtar Deney

İnsan Genomu

Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome

International Human Genome Sequencing Consortium *Nature*, Volume 409, 2001, pages 860-921.

The Sequence of the Human Genome

J.Craig Venter and 273 others *Science*, Volume 291, 2001, pages 1304-1351

Bağlam

Tüm genom dizilenmesi fikri, ilk kez 1980'lerin ortasında ortaya çıkmıştır. İlk başta bilim insanları tarafından, uygulanabilir olmayan bir girişim olarak görüldüğü için büyük bir kuşkuyla yaklaşılmıştır. O zamanlarda dizilenmiş olan en büyük genomun, 180,000 baz çifti DNA'dan oluşan Epstein-Barr virüs olduğu düşünüldüğünde, 20,000 kat daha büyük olan insan genomunun dizilenmesi hayal edilemez bir fikirdi. Ne var ki, biyolojideki bu denli büyük bir proje fikri, o zamanlar A.B.D. Enerji Bölümü Sağlık ve Çevre Araştırması Ofisi başkanı olan Charles DeLisi gibi kişilerin hayal gücünü cezbetti. 1986 yılında, DeLisi, İnsan Genom Girişimi'nin Enerji Bölümü'nde proje olarak başlatılmasında başarılı oldu.

Proje, 1988 yılında A.B.D. Ulusal Araştırma Konsey'indeki bir komite tarafından onaylanınca daha geniş çapta bir destek buldu. Bu komite, pek çok model organizmanın dizilenmesi ve eş zamanlı olarak insan kromozomlarının detaylı haritalarının geliştirilmesini de kapsayan daha geniş çaplı bir uğraş önerdi. Bu uğraş, ilk başta ABD Ulusal Sağlık Enstitü'sünde James Watson'ın (DNA yapısının kaşiflerinden) liderliğinde, daha sonra Francis Collins'in liderliğinde yürütülmüştür.

Dizisi tamamlanmış ilk genom, Craig Venter ve arkadaşları tarafından 1995'te rapor edilmiş olan *Haemophilus influenzae*'nınkiydi. Venter, Ulusal Sağlık Enstitüsü'ndeki genom dizileme uğraşının bir parçasıydı; ancak daha sonra 1991 yılında, kar gütmeyen bir şirket olan Genom Araştırma Enstitüsü'nün lideri olarak ayrıldı. Aynı zamanda, insan genomunun haritalanmasında önemli ilerleme kaydedilmişti; ve *H. influanzae*'nin ilk dizisi, 1998 yılında bakteriler, maya, ve *C.elegans* dizileri tarafından takip edilmiştir.

1998 yılında Venter, Celera Genomics adında yeni bir şirket kurdu; ve bütün insan genom dizisinin üç yılda elde edilmesi amacıyla ileri dizileme teknolojilerini içeren planlarının duyurusunu yaptı. Collins ve kamu tarafından finanse edilen genom projesinin diğer liderleri, uğraşlarını ivmelendirerek karşılık verdiler; bu durum insan genomunun taslak dizisinin Şubat 2001 tarihinde rapor edilmesiyle sonuçlanan bir yarışa neden olmuştur.

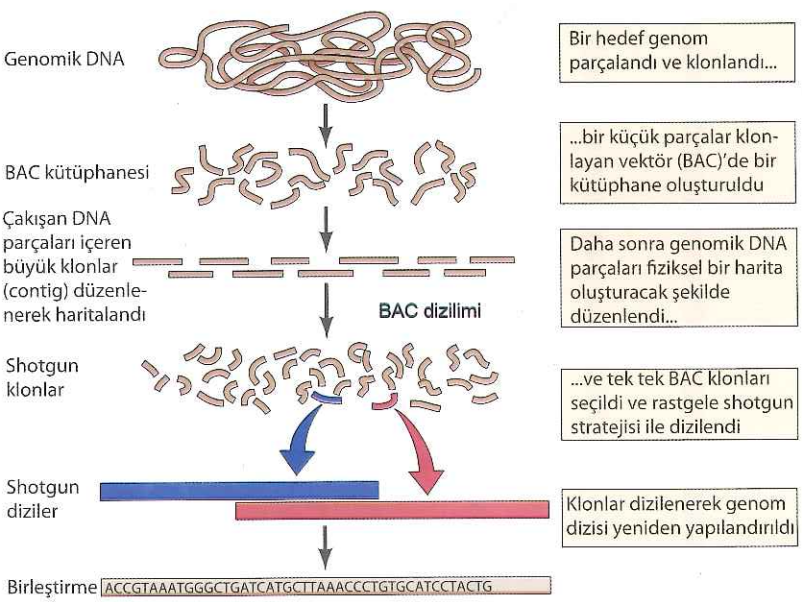
Craig Venter

Eric Lander

Deneyler

İki bilim insanı grubu, insan genom dizisini elde etmek için farklı yaklaşımlar kullanmışlardır. Kamu tarafından fonlanan, uluslararası insan genom dizileme konsorsiyumu adındaki Eric Lander liderliğindeki takım, Maya ve *C. elegans* genomlarının dizilerinin belirlenmesinde kullanılan yaklaşımdaki gibi (Şekil'e bakınız), önceden insan genomuna haritalanmış *Bakteri Yapay Kromozom* klonlarından köken alan DNA parçalarını dizilediler. Bunun aksine, Celera Genomics takımı, Craig ve arkadaşlarının ilk kez *H.influanzae* genomu dizilemesinde kullandıkları tüm-genom shotgun yöntemini kullandılar. Bu yaklaşımda, DNA parçaları rastgele dizilenerek makul tam genom dizisi için üst üste çakışan kısımlar kullanıldı. Dizilerin her ikisi de, insan genornunun yaklaşık 2900 milyon baz çifti (Mb) DNA'lık ökromatin kısmına karşılık geldi.

(sonraki sayfada devam edilmiştir)



Bakteriyel yapay kromozomları (Bacterial Artificial Chromosome: BAC) kullanılarak çakışan ortak kümeler (kontigler) kullanılarak yapılandırılan ve insan kromozomlarını haritalayan genom dizileme stratejisi.

Anahtar Deney

Genomun tekrar dizilerince zengin heterokromatin kısmı (yaklaşık 300 Mb) dizilenmeden kaldı.

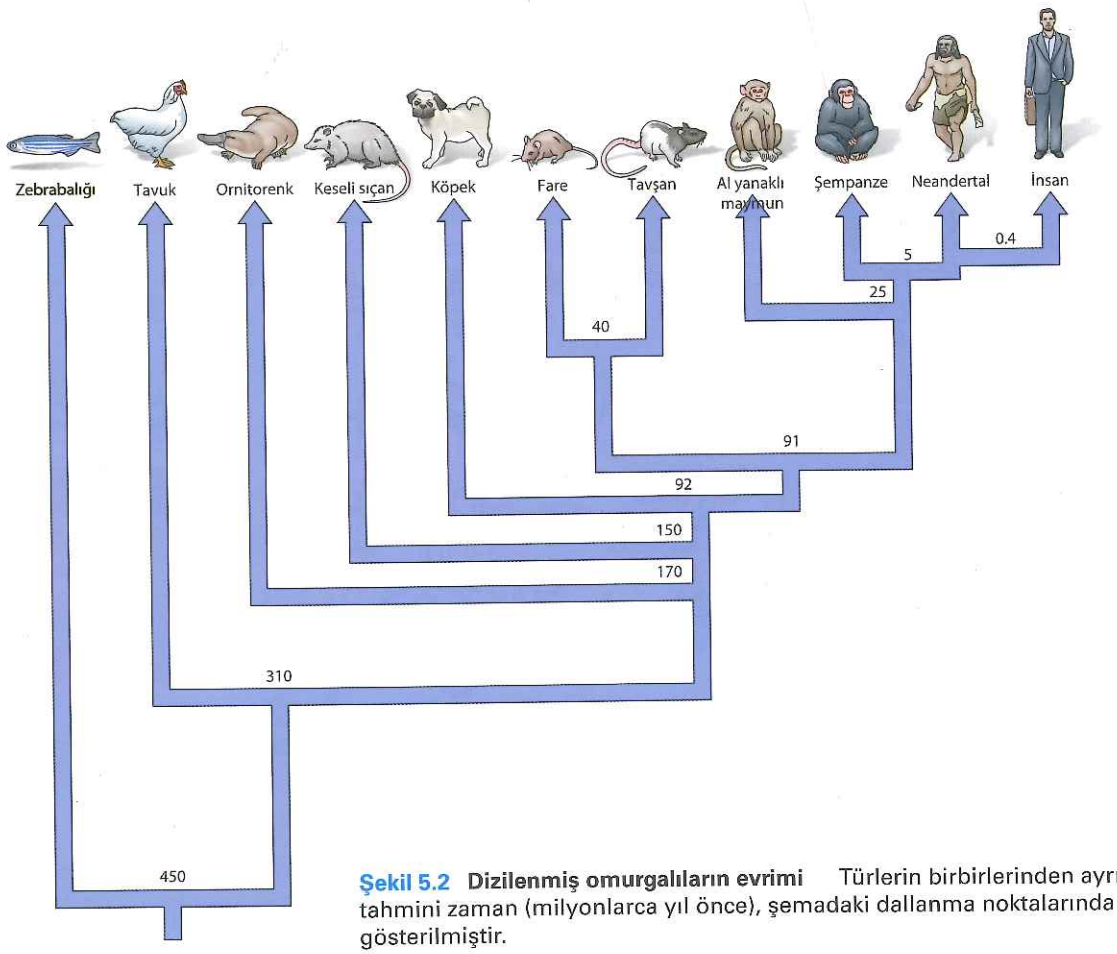
Bu ilk rapor edilen dizilerin ikisi de tamamlanmış diziden ziyade taslak dizilerdi. Daha sonraki uğraşlar diziyi tamamlayıp; yüksek doğrulukta insan genomunun 2004 yılında rapor edilmesini sağlamıştır.

Etki

İnsan genom dizisinden pekçok önemli sonuç çıkmıştır. En çarpıcı olanı, insan genomunun tamamlanmış dizisinde beklenenden daha az sayıda (20,000-25,000) gene olduğunun anlaşılmasıdır. Bu beklenmedik sonuç, genomdaki protein kodlamayan dizilerin, gen ifadesini kontrol ettikleri çoklu mekanizmalar bağlamında, rollerinin farkedilmesine yol açmıştır.

2004 yılında çıkartılan ilk sonuçların ötesinde, diğer genom dizileriyle birlikte insan genom dizisi, biyoloji ve tıp alanında yeni bir temel oluşturmuştur. İnsan genom dizisinin etkisi, yeni gen ve işlevlerinin keşfedilmesi, gen regülasyonunun anlaşılması, insan hastalıklarının temellerinin aydınlatılması, bireylerin genetik özeliklerine göre yeni önlem ve tedavi yollarının geliştirilmesi gibi konularda hissedilmiş ve hissedilmeye devam etmektedir. İnsan genom bilgisinin nihai katkısı, Venter ve meslektaşlarının ifade ettiği gibi "İnsan biyolojisinin önündeki asıl zorluk.... aklımızın, var oluşumuzu araştırmak için düşüncelerimizi nasıl bu derece mükemmel bir şekilde organize ettiğidir" sorusunun anlaşılması olacaktır.

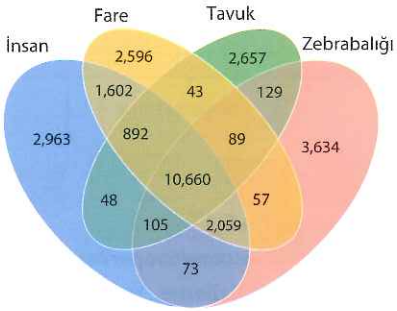
gelmişlerdir. İnsan genomu, Drosophila ve C.elegans'la karşılaştırıldığında, omurgalılarda daha üst seviyedeki karmaşıklığa açıklık getirecek şekilde immün cevap, sinir sistemi ve kan pıhtılaşmasının yanı sıra, gelişim, hücre sinyal iletimi ve gen ifadesinin düzenlenmesi ile ilgili olarak daha fazla gen barındırmaktadırlar.



Şekil 5.2 Dizilenmiş omurgalıların evrimi Türlerin birbirlerinden ayrıldığı tahmini zaman (milyonlarca yıl önce), şemadaki dallanma noktalarında gösterilmiştir.

Diğer omurgalıların genomları

İnsan genomunun yanısıra, balıklar, kurbağalar, tavuklar, köpekler, kemirgenler ve primatlar da dahil olmak üzere, büyük ve giderek artan sayıda omurgalı genomu dizilenmiştir (**Şekil 5.2**). Bu diğer canlıların genom dizileri büyüklük olarak insan genomlarıyla aynıdır, ve benzer sayıda gen barındırılar. Bu diziler, insan genomu ile ilginç karşılaştırma olanağı sağlarlar ve farklı model organizmalarla çalışmaların kolaylaşması ve gen ifadesini kontrol eden düzenleyici (regulatory) elemanları da içeren farklı tipteki işlevsel dizilerin keşfini kolaylaştırmaktadır. Örneğin, insan, fare, tavuk ve zebrabalığı genomlarının karşılaştırması protein kodlayan genlerin yaklaşık yarısının bütün omurgalılarda aynı olduğunu göstermekte iken, öte yandan 3000 kadar gen bu dört türün her biri için spesifiktir (**Şekil 5.3**).



Şekil 5.3 Omurgalı genomlarının karşılaştırması İnsan, fare, tavuk ve zebrabalığı genomlarında ortak olan genlerin sayısı belirtilmiştir (K. Howe'den alınmıştır, 2013 *Nature* 496: 498.)

İnsan genomu dışında dizilenmiş olan memeli genomları, platypus, keseli sıçan (opossum), fare, sıçan, köpek, makak, ve şempanzeyi içermektedir. Önceki bölümlerde tartışıldığı üzere, memeli genetiği ve gelişim çalışmalarında, fare temel model organizma iken, sıçan ise insan fizyolojisi ve tıp araştırmalarında model organizmadır. Fare, sıçan ve insanların genlerinin %90'ı ortaktır ve böylece fare ve sıçan genom dizilerinin mevcut olması bu alanlarda araştırma için temel veri tabanları sağlamaktadır. Pek çok farklı evcil köpek soyunun bulunması, morfolojinin, gelişimin, ve insan ve köpekleri aynı ölçüde etkileyen pek çok kompleks hastalığın genetik temellerinin anlaşılması bağlamında, köpek genom dizisini özellikle önemli kılmaktadır. Fiziksel ve davranışsal özellikler yanı sıra pek çok kanser türü, körlük, sağırlık ve metabolik hastalıkları kapsayan birçok değişik hastalığa yatkınlık anlamında farklılık gösteren yaklaşık 300 kadar köpek soyu vardır. Bu özellikler her bir köpek soyuna özgü olup, sorumlu olan genlerin keşfini büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır. Örneğin, 6. Bölüm'de tartışıldığı gibi, köpek bacaklarında soya spesifik farklılıklar üzerinde yapılan çalışmalar sayesinde bu özelliğin oluşumununa neden olan spesifik bir gen yeniden düzenlenmesi bulunmuştur. Köpek genomları üzerinde son yıllarda yapılan çalışmalar sayesinde, tüy rengi ve bazı küçük soyların vücut büyüklüklerinden sorumlu genler keşfedilmiştir. Bazı köpek soylarında ortak olan birçok kanser türü de dahil olma üzere pekçok hastalık türünün genetik temellerinin anlaşılmasına yönelik benzer türde analizler sürmektedir. Bu hastalıkların çoğu, köpek ve insanları benzer ölçüde etkiledikleri için, bu çalışmalara ait sonuçların insan sağlığının yanı sıra veterinerlik tıbbında da etkilerinin olması beklenmektedir. Köpeklerde davranışların genetik analizinin gelecekte yapılmasını bekleyebiliriz. Ayrılık kaygısı da dahil olmak üzere birçok köpek davranışının insanlarda da gözlemlendiği düşünüldüğünde, psikologların, bizim binlerce yıldır en yakın dostumuz olan bu türlerden öğrenecek pekçok şeyi olabilir.

Şempanze, bonobo, orangutan ve rhesus makaklar da dahil olmak üzere, diğer primatların genom dizileri bizim genomumuzdaki, insan genomunu diğer primatlardan ayırt eden spesifik özelliklerin anlaşılmasına yardımcı olabilir. Ne var ki, ilginç olanı, bu dizilerin karşılaştırılmasının, bizi insan yapan nedir sorusuna kolay bir yanıt önermiyor olmasıdır. İnsan ve şempanzelerin genom dizlerinin yaklaşık %99'u aynıdır. Belki de ilginç olanı, insan ve şempanze dizilerindeki değişikliklerin, çoğu proteinin amino asit dizilerinde değişikliklere yol açan gen kodlayan dizilerdeki değişilikler olmasıdır. Her ne kadar bu amino asit değişikliklerinin çoğu proteinlerin işlevini etkilemiyor olsa da, şempanze ve insanda binlerce genin farklı yapı ve ekspresyon seviyelerine

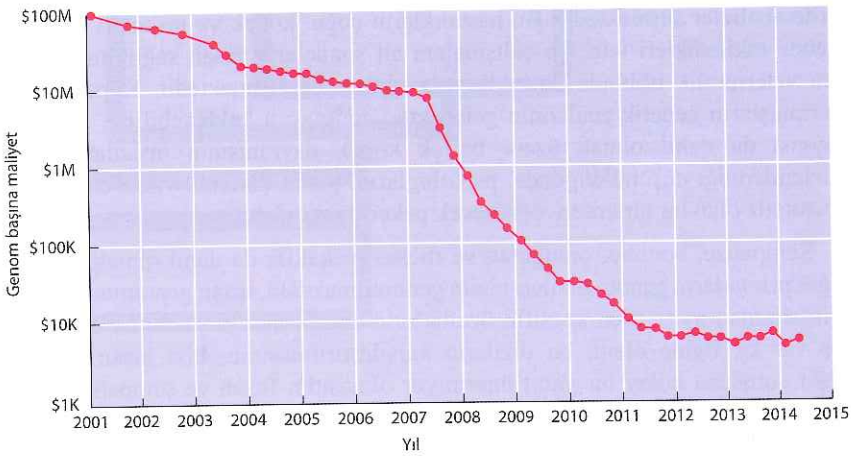
sahip oldukları düşünüldüğünde, insanların kökenine ait değişikliklerin keşfinin kolay bir iş olmadığı ortaya çıkmaktadır.

Bizim en yakın evrimsel akrabamız olan Neandertallerin genomu da kısa bir süre önce dizilenmiştir. Modern insanla Neandertallerin yaklaşık 300,000-400,000 yıl önce ayrıştıkları tahmin edilmektedir. Neandertaller ile modern insanın genomlarının %99.9'dan fazlası aynı olup bu da birbirleri ile şempanzeden daha yakın akraba olduklarını göstermektedir. İlginç olarak, bu farklılıklar, modern insanda korunmuş olan yaklaşık olarak yalnızca 90 geninin kodlayan dizisini değiştirmektedir. Bu genler deri, iskelet gelişimi, metabolizma, biliş (*cognition*) ile ilgilidir. Daha sonra yapılacak çalışmalar, bu genlerin, modern insanın evrimindeki olası rollerini açıklayabilir.

Animasyon 5.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a5.1
Yeni Nesil Dizileme Yeni nesil DNA dizilemede, milyonlarca kalıp DNA eşzamanlı olarak dizilendiğinden, dizilenme hızı önemli ölçüde artar.

Yeni nesil dizileme ve kişisel genomlar

İnsan genomu ve yukarda verilmiş olan model organizmalara ait diğer genomlar, ilk kez Fred Sanger tarafından 1977 yılında tanımlanan ve 4. Bölüm'de tartışılmış olan dideoksinükleotid yöntemi ile dizilenmiştir (bkz. Şekil 4.20). Bu temel yöntemin otomatize edilmesi, hız ve kapasitesini, tüm genom dizilemesine imkan verecek bir biçimde arttırmış olup, 2004 yılında yüksek kalitede insan genom dizisinin başarı ile tamamlanmasını sağlamıştır. Ancak, güçlü bir otomatize sistemle bile, bu yaklaşımı uygulayarak genom dizileme yavaş ve pahalıydı; bu yüzden tüm genom dizilemesi çok büyük bir işdi. Örneğin, ilk insan genomunun dizilenmesi 15 yıl kadar sürmüş olup, maliyeti yaklaşık olarak 3 milyar dolar olmuştur. 2005 yılından başlayarak, dizileme hızını büyük ölçüde arttıran ve aynı zamanda maliyeti düşüren, **yeni nesil dizileme** (*next-generation sequencing*) adı verilen yeni yöntemler geliştirilmiştir (Şekil 5.4). 2001 yılından bu yana insan genomu dizileme bedeli, 100 milyon dolardan birkaç bin dolara olacak şekilde, 10,000 kattan daha fazla düşmüştür. Dizileme hızı bundan da fazla yükselmiş olup insan genom dizilemesinin birkaç günde gerçekleştirilmesi artık mümkündür. Dizileme teknolojilerindeki bu önemli değişimler, çok sayıda bireyin tüm genom dizilenmesinin kapısını açmış olup; tüm insanlığı etkileyen kanser ve kalp hastalıkları ile Parkinson ve Alzheimer gibi sinir sitemi dejeneratif

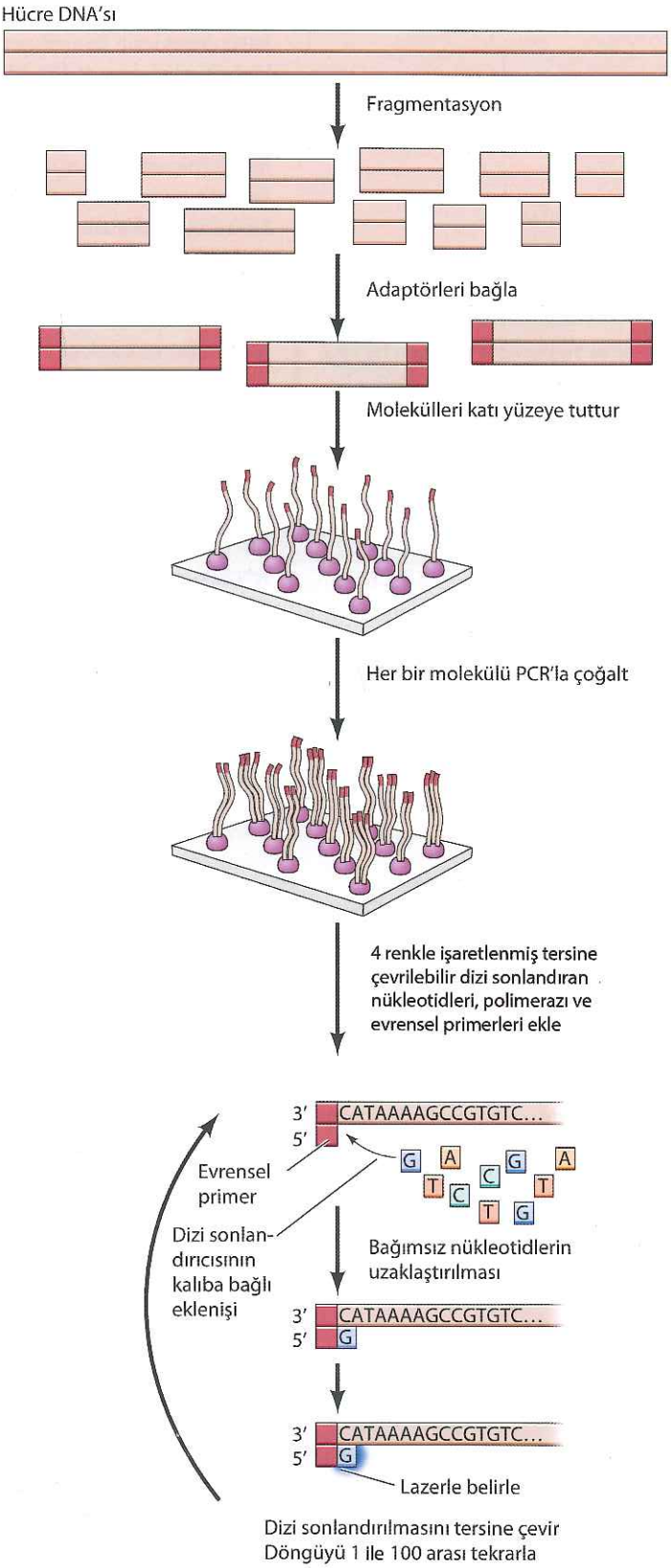


Şekil 5.4 DNA dizilemesindeki gelişmeler İnsan genomunu dizilemenin maliyeti 2001 yılından 2015'e kadar yaklaşık olarak 100 milyon dolardan bir kaç bin dolar seviyesine düştü. (Ulusal İnsan Genom Araştırma Enstitüsü verilerinden.)

hastalıklarını da içeren, pekçok hastalığın genetik temellerinin anlaşılmasında yeni yaklaşımların önünü açmıştır. Ayrıca, kişiye özel, özgün genetik yapımızın anlaşılmasının kişiye özgü hastalık önleme ve tedavi stratejilerinin gelişmesine yol açması beklenmektedir.

Yeni nesil dizileme (massif paralel dizileme de denmektedir), milyonlarca kalıp DNA'nın tek bir reaksiyonda aynı anda dizilendiği pekçok değişik yönteme verilen ortak isimdir. Bu yöntemlerin temel genel stratejisi **Şekil 5.5**'te gösterilmiştir. Önce, DNA parçalanır, amplifikasyon ve dizileme reaksiyonları için primer görevi görecek olan adaptör diziler her bir DNA parçasının ucuna eklenir. Daha sonra tek DNA molekülleri katı bir yüzey üzerine tutturulup, mekansal olarak tutturulup ayrılmış kalıp kümeleri oluşturmak için PCR ile amplifiye edilir. Daha sonra, milyonlarca kalıp DNA, floresan nükleotitlerin eklenmesini görüntüleyen lazerler kullanılarak paralel olarak dizilenebilir. Üst üste çakışan geniş bir DNA fragman kolleksiyonundan köken alan diziler bir araya getirilerek kesintisiz genom dizisi elde edilir. Alternatif olarak, bilinen bir genom dizisi (örneğin insan genomu) mevcutsa bu dizi belli bir bireyin DNA parçalarının hizalanacağı referans genom olarak kullanılabilir.

Dizilenen ilk bireysel genomlar, 2007 ve 2008 yılında rapor edilen Craig Venter ve James Watson'a aittir. O zamandan beri binlerce kişinin genom dizisi belirlenmiştir. Bir bireyin genomunun dizilenmesinin maliyetinin birkaç bin dolar civarı olduğu düşünüldüğünde, kişisel genom dizilemenin tıp uygulamalarının bir parçası haline geleceği öngörülebilir. Bu durum, hem hastalıklardan korunma hem de hastalıkları tedavi etme bağlamında, terapilerin, hastaların bireysel ihtiyaçlarına uygun hale getirilmesine imkan



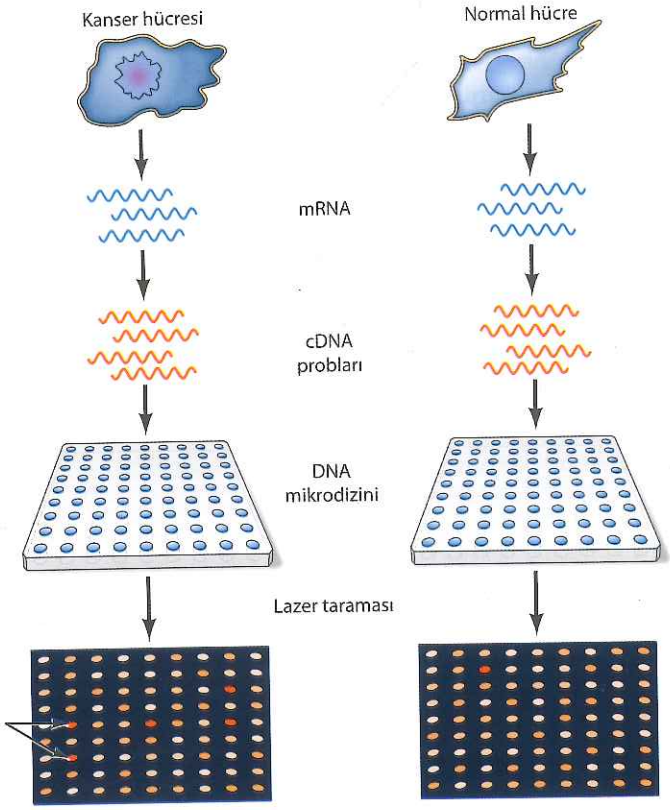
Şekil 5.5 Yeni nesil dizileme Hücresel DNA parçalanır ve her bir parçanın uçlarına adaptör diziler eklenir. Tek DNA parçaları daha sonra katı bir yüzeye tutturulur ve milyonlarca molekül kümesi oluşturacak şekilde PCR yoluyla çoğaltılır. Dört adet renkle işaretlenmiş geri döndürülebilir dizi sonlandıran nükleotidler, DNA polimeraz ve adaptör dizileri tanıyan primerlerle birlikte eklenir. İşaretli bir nükleotidin her bir DNA molekül kümesine eklenmesi bir lazerle tespit edilir. Eklenememiş nükleotidler ayrıştırılır, dizi sonlandırma geri döndürülür ve milyonlarca kümenin dizisini eşzamanlı olarak elde etmemizi sağlayacak döngü tekrar edilir.

verecektir. Belki de bunun en iyi güncel örneği, 19. Bölüm'de tartışıldığı gibi, hasta bireylerin kanser genomlarının dizilenmesi sonucu bulunan mutasyonları hedefleyen kanser tedavisi için yeni ilaçların geliştirilmesidir. Gelecekte sağlıklı bireylerin genomlarının, hastalığa yatkınlık sağlayan genlerinin bulunması ve daha sonra gerekli müdahalelerinin yapılması bağlamında, dizilenmelerinin hastalalıkların önlenmesi konusunda önemli rol oynamasını bekleyebiliriz. Örneğin, genom dizileme, mastektomi yoluyla engelenebilecek olan meme kanserine yakalanmayla ilişkili yüksek risk barındıran mutant genleri taşıyan kadınları belirleyebilir. Genomik alanındaki süre gelen gelişmelerin yalnızca tıbbi uygulamalarda artışa neden olmakla sınırlı kalmayıp, genlerin diğer özgün özelliklere katkısının aydınlatılmasına, karmaşık insan davranışlarına yol açan gen ve çevre etkileşimlerinin daha iyi anlaşılmasına neden olacağına hiç şüphe yoktur.

Animasyon 5.2
sites.sinauer.com/cooper7e/a5.2
DNA Mikrodizin Teknolojisi
DNA Mikrodizinleri on binlerce genin ifadesinin eşzamanlı olarak analiz edilmesine imkan verir.

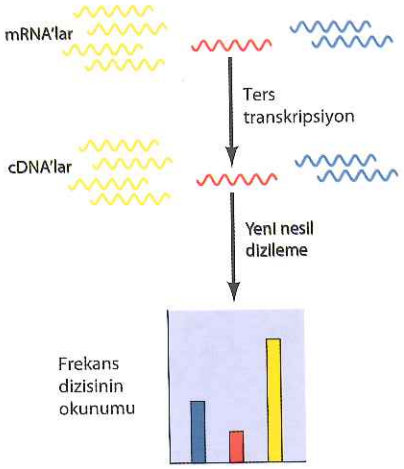
Gen ekspresyonunun geniş çaplı analizleri

Tamamlanmış genom dizilerinin mevcut olması, araştırmacılara, gen ekspresyonunu tüm genom düzeyinde çalışma imkan verir. Bu yüzden, bir genin ifadesini analiz etmek yerine, bir hücrede transkribe olan bütün RNA'ların **(transkriptom)** analizini yapmak şimdi mümkün hale gelmiştir. Geniş çaplı bir gen ekspresyon analizi için yaygın olarak kullanılan yöntem, onbinlerce genin ekspresyonunu eşzamanlı olarak analiz etmeye imkan veren **DNA mikrodizleri** ile hibridizasyondur. Bir DNA mikrodizin, üzerine oligonükleotidlerin robotik bir sistemler kullanılarak yüksek yoğunlukta küçük spotlar halinde yerleştirildiği cam veya slikon bir çipten oluşur. (**Şekil 5.6**). Dizin üzerindeki her bir nokta bir çeşit oligonükleotidden oluşur. Tipik



Şekil 5.6 DNA mikrodizinler Kanser hücrelerinde ve normal hücrelerde gen ifadesinin karşılaştırmalı analizinin örneği. Kanser hücrelerinden ve normal hücrelerden elde edilen mRNA, floresan boyayla işaretlenmiş cDNA problarının sentezlenmesinde kalıp olarak kullanılır. cDNA probları 20,000 veya daha fazla insan genine karşılık gelen oligonükleotid bölgeleri yerleştirilmiş bölge içeren DNA mikrodizinlerine hibridize edilir. Her genin göreli ifade seviyesi, mikrodizindeki her bir pozisyondaki floresan yoğunluğuyla gösterilerek kanser hücreleri ve norma hücrelerdeki ifade seviyeleri karşılaştırılabilir. Kanser hücrelerinde yüksek seviyede ifade edilen örnek genler oklarla belirtilmiştir.

bir çipe onbinlerce özgün prob eklenebilir; dolayısıyla hücresel genomlardaki bütün genleri temsil eden dizileri içeren DNA mikrodizinlerinin kolaylıkla üretilmesi mümkündür. Şekil 5.6'da gösterildiği gibi, DNA mikrodizinlerin yaygın kullanımlarından biri, iki farklı hücre tipinde eksprese olan genlerin karşılaştırması örneğinde olduğu gibi, gen ifade çalışmalarıdır. Bu tür bir deneyde cDNA probları, her iki hücre tipinde de (kanser hücreleri ve normal hücreler gibi) eksprese olan mRNA'lardan ters transkripsiyon ile sentezlenmiştir. cDNA'lar floresan boylarla işaretlenir ve üzerinde 20,000 veya daha fazla insan geninin oligonükleotid spotlar ile temsil edildiği DNA mikrodizinlere hibridize edilir. Dizinler daha sonra yüksek çözünürlükte bir lazer tarayıcılar ile analiz edilirler ve her bir genin transkripsiyonunun göreli miktarı, dizindeki uygun noktadaki floresan yoğunluğu üzerinden belirlenir. Daha sonra kanser hücreleri ve normal hücreler arasındaki göreli gen ifade seviyelerini, cDNA'larının hücredeki her bir geni temsil eden oligonükleotidlere hibridizasyon yoğunluklarını karşılaştırarak analiz etmek mümkündür.



Şekil 5.7 RNA-seq Hücresel mRNA'lar ters transkripsiyon ile, yeni nesil dizileme işlemine alınacak olan cDNA'lara dönüştürülürler. Sonuçlar bir hücredeki bütün mRNA'ların dizisini verir. Her bir mRNA'nın göreli miktarı, toplam dizi okumasında temsil edilen dizi frekansına bağlı olarak belirlenir.

Yeni nesil dizilemenin sürekli gelişimi, DNA dizilemenin bir hücrede ifade edilen tüm RNA'ların belirlenmesini ve miktar tayini için kullanılmasını mümkün kılmıştır. **RNA-*seq*** denilen bu yaklaşımda, hücresel mRNA'lar izole edilir, ters transkripsiyon yoluyla cDNA'ya çevrilir ve yeni nesil dizileme işlemine tabi tutulur (Şekil 5.7) . Mikrodizin analizlerinin aksine, RNA-*seq* ile sadece mikrodizindeki problara hibridize olanları belirlemek yerine, bir hücrede transkribe olan tüm RNA dizileri belirlenir. RAN-*seq*'le belirlenen bireysel dizilerin frekansı hücredeki RNA miktarıyla orantılıdır; böylece bu analiz transkribe olan dizilerin miktarının yanı sıra kimliğin de belirlenmesini sağlar. RNA-*seq* hassasiyeti tek hücre seviyesinde analize izin verecek yeterlikte olup, bu yöntem ile tek bir hücrenin transkriptomları belirlenebilir.

RNA-*seq* analizi sonucu ortaya çıkan şaşırtıcı sonuçlardan biri, insan hücrelerinde protein-kodlayan genlere karşılık gelenlerden çok daha fazla mRNA'nın transkribe olmasıdır. Sonraki bölümde tartışıldığı gibi, bu çalışmalar gen regülasyonunda kritik rolleri olan yeni RNA sınıflarının keşfedilmesine yol açmıştır.

Proteomik

Hücre genomlarının ve transkriptomlarının analizi hücre işleyişinin anlaşılmasında sadece ilk adımları oluşturmaktadır. Proteinler nerdeyse bütün hücresel aktivitelerin gerçekleştirilmesinden doğrudan sorumlu oldukları için sadece bir hücrenin genomundan hangi proteinlerin kodlandığının anlaşılması değil, hangi proteinlerin gerçekte ifade olduğu ve hücrede nasıl işlev gösterdiklerinin de anlaşılması gerekmektedir. Hücre işlevininin tamamen anlaşılması sadece genom dizisi ve transkripsiyonunun analizi değil, aynı zamanda protein bileşenlerinin de sistematik analizini gerektirir. Bu hücre proteinlerinin büyük ölçekli analizi **(proteomik)**, bir hücrede ifade edilen bütün proteinlerin **(proteom)** keşfedilmesi ve ekspresyonlarının kantitasyonuna ek olarak, bu proteinlerin farklı hücre içi organellere lokalizasyonun belirlenmesi ve hücre aktivitelerini yöneten proteinler arası etkileşim ağlarının izah edilmesi amacını taşır.

Hücre proteinlerinin tanımlanması

Ökaryotik hücrelerdeki farklı proteinlerin sayısı tipik olarak genlerin sayısından çok daha fazladır. Bu durum, pek çok genin alternatif kesip-çıkartma ve buna

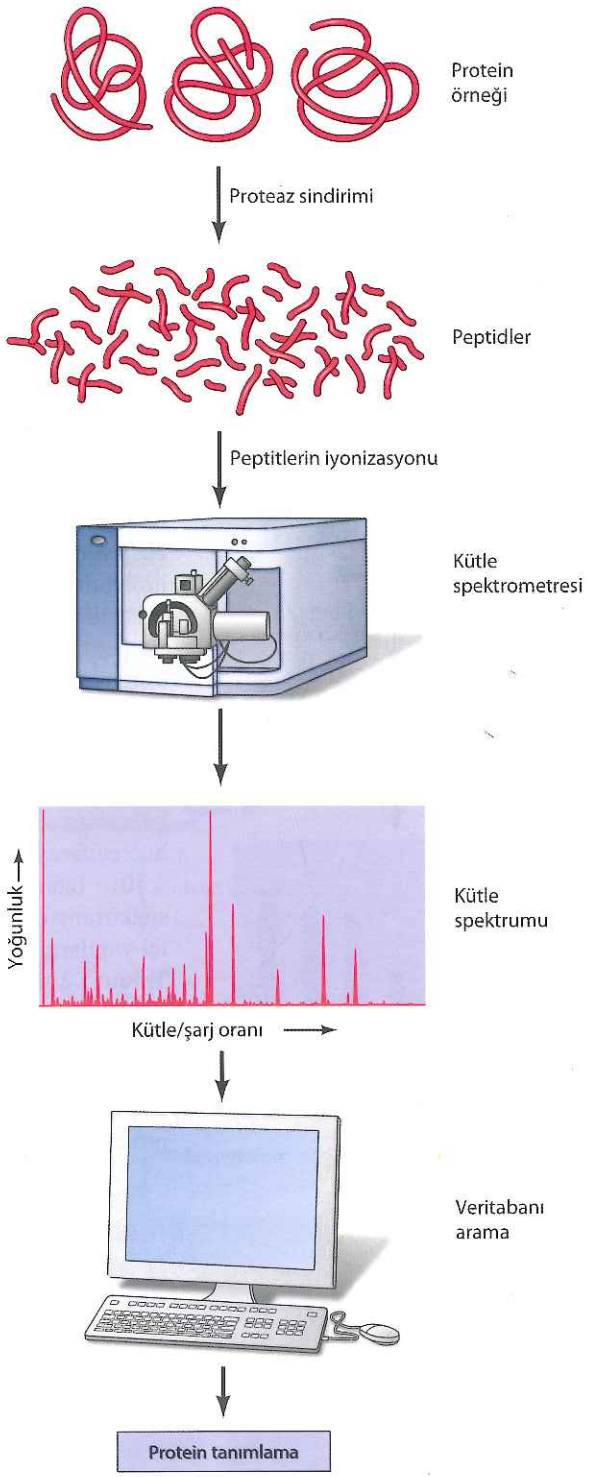
Bilgi İçin

Kütle spektrometresinin, atletlerin kanında perfomans arttırıcı ilaçların varlığının test edilmesi dahil pek çok kullanım alanı vardır.

bağlı olarak farklı polipeptidler kodlayan (6. Bölümde tartışılmıştır) birçok farklı mRNA üretecek şekilde ifade edilmesinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, proteinler, fosfat grupları, karbonhidratlar ve yağ moleküllerinin eklenmesi gibi pekçok farklı yolla modifiye edilebilirler. Örneğin, insan genomu yaklaşık 20,000 farklll protein kodlayan gen içermektedir ve belirlenen herhangi bir hücrede eksprese olan genlerin sayısının 10,000 civarında olduğu düşünülmektedir. Ne var ki, alternatif kesip-çıkarma (splicing) ve protein modifikasyonları nedeniyle, bu genlerin 100,000'den fazla farklı protein oluşturabildikleri tahmin edilmektedir. Dahası, bu proteinler çok farklı seviyelerde ifade edilebilirler. Proteomiğin amacı olan, bir hücredeki bütün proteinlerin karakterizasyonu, bu yüzden önemli ölçüde güçlük teşkil eder. Başlıca gelişmeler, geçen birkaç yılda kaydedilmiş olmasına rağmen, büyük boyutta teknolojik engeller, hücre proteomlarının tamamen karakterizasyonunun başarılmasından önce, üstesinden gelinmeyi beklemektedir.

Hücre proteinlerinin büyük ölçekte ayrıştırılması için geliştirilmiş olan ilk teknoloji, **iki boyutlu jel elektroforezi**dir (**Şekil 5.8**). Bir hücre proteinlerinin karışımı, ilk olarak, bir yanından diğer yanına pH gradiyenti olan bir tübün içinde elektroforeze maruz bırakılır. Her bir protein, içeriğindeki asidik ve bazik amino asitlere göre belirlenen yükünün nötralize olacağı pH'ya kadar yürür. Denatürasyon ve SDS bağlanmasından sonra, proteinler büyüklük bakımından ayrışacakları koşullarda, küçük boyutta olanların jelde daha hızlı hareket ettikleri, ikinci bir boyutta elektroferez işlemine maruz bırakılırlar. Bu yaklaşım, bir hücre özütündeki binlerce çeşit proteini ayrıştırma kapasitesine sahiptir. Ancak bu, memeli hücresinde eksprese edilen toplam protein sayısından çok daha azdır ve dikkat edilmesi gereken nokta ise, iki boyutlu jel elektroferezi hücrede fazla miktarda eksprese olan proteinleri belirlemeye yöneliktir.

Şekil 5.8 İki boyutlu jel elektroferezi Bir hücre proteinlerinin karışımı ilk önce bir pH gradiyentinde elektroforeze tabi tutulur, böylece yüklerine göre ayrışırlar (yatay eksen). Proteinler daha sonra, büyüklüğe göre ayrışacakları ikinci bir boyutta elektroforeze maruz bırakılırlar (dikey eksen). Jel, farklı proteinlere karşılık gelen noktaları gösterecek şekilde boyanır. Gösterilen örnek, *E. coli*'den elde edilen proteinlerin jelidir. (P.H.O'Farrell'den alınmıştır. 1975. J. Biol. Chem. 250: 4007; Patrick H.O'Farrell'in izli ile)

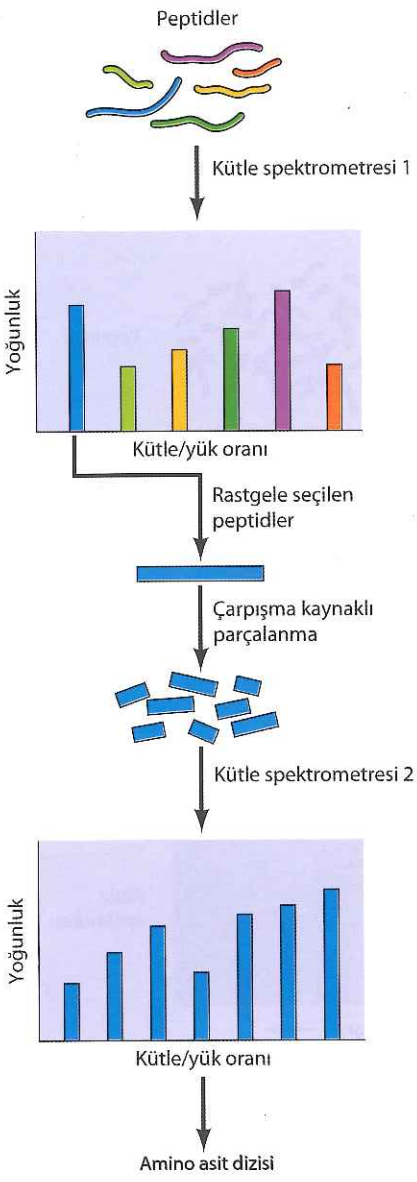


Şekil 5.9 Proteinlerin kütle spektrometri aracılığıyla tanımlanması Bir protein, kendisini küçük peptidlere bölen proteazlarla parçalanır. Peptidler daha sonra iyonize edilir ve her bir peptidin kütle-yük oranı kütle spektrometresinde analiz edilir. Sonuçlar, bir kütle spektrumu olarak gösterilir ve bu spektrum, protein tanımlanması için, bilinen bütün proteinlerin teorik kütle spektrumu ile karşılaştırılır.

Protein tanımlamasında güçlü bir yöntem olarak 1990'lı yıllarda geliştirilen **kütle spektrometresi**, günümüz proteomik çalışmalarında kullanılan en temel araçtır. (Şekil 5.9). İki boyutlu jelden ayrıştırılabilen analiz edilecek proteinler, proteazlar ile yaklaşık 20 aminoasitlik küçük protein parçalarına (peptidlere) kesilerek sindirilirler. Yaygın kullanılan protezlardan biri, proteinleri lizin ve arjinin kalıntılarının karboksi terminal kısmından kesen tripsindir. Peptidler daha sonra lazer ya da yüksek elektiriksel potansiyeli olan bir alandan geçirilerek iyonize edililir ve her bir peptidin kütle-yük oranını belirleyen kütle spektrometre içine yerleştirilirler. Bu, her bir triptik peptidin kütle-yük oranına karşılık gelen bir tepecik ile gösterildiği bir kütle spektrumu oluşturur. Daha sonra, deneysel olarak elde edilen kütle spektrumu ile bilinen tüm proteinlerin triptik peptidlerini temsil eden teorik kütle spektrum veribankalarının bilgisayar algoritmaları kullanılarak karşılaştırılması bilinmeyen proteinin tanımlanmasına imkan verir.

Peptidlerin kütlelerinden daha detaylı dizi bilgisi **tandem kütle spektrometrisi** ile elde edilebilir (Şekil 5.10). Bu teknikte, ilk kütle spektrumundaki özgün peptidler otomatik olarak seçilir ve peptid bağlarının rastlantısal olarak kısmen kırıldığı "çarpışma hücresine" (*collision cell*) girer. Her bir peptide ait kısmen degrede olmuş ürünlerin ikinci bir kütle spektrumu belirlenir. Her bir amino asit özgün bir moleküler ağırlığa sahip olduğu için, peptidin amino asit dizisi bu veriden anlaşılabilir. Fosforilasyon gibi protein modifikasyonları, modifiye olan amino asitin kütlesini değiştirdiği için belirlenebilir.

Güçlü olduğu halde, iki boyutlu jel / kütle spektrometre yaklaşımı sınırlıdır. Yukarıda belirtildiği gibi, iki boyutlu jel, en fazla miktarda bulunan hücre proteinlerinin tespitini destekler; ve zar proteinlerini bu yaklaşımla ayrıştırmak karateristik olarak zordur. Bu sınırlamalardan dolayı, iki boyutlu jelin, bir hücreye ait bütün proteinlerin küçük bir kısmını temsil eden yalnızca birkaç yüz gen tarafından kodlanan proteinleri ayrıştırma kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Kütle spektrometresi, bir protein karışımını analiz etmede, başlangıçtaki iki boyutlu jel elektroforezini ekarte eden alternatif bir yaklaşımdır. "Gelişigüzel kütle spektrometre" (*shotgun mass spectrometry*) adı verilen bu yaklaşımda hücre proteinlerinin karışımı bir protezla (tripsin gibi) parçalanır; ve kompleks peptid karışımı tandem kütle spektrometresiyle dizilenir. Her bir ayrı peptidin dizisi, ilk başlangıçtaki karışımda bulunan



Şekil 5.10 Ardışık kütle spektrometresi Bir peptid karışımı kütle spektrometresi 1'de ayrıştırılır. Daha sonra, rastgele seçilmiş bir peptid, çarpışma yoluyla uyarılmış peptid bağ kırılması yoluyla parçalanır. Bir amino asitte farklılık gösteren parçalar ikinci bir kütle spektrometre 2'de ayrılır. Parçalar bir aminoasitte farklı oldukları için, peptidlerin aminoasit dizileri belirlenebilir.

proteinlerin tanımlanması için, daha sonra veritabanı araştırmasında kullanılır. Farklı hücre tiplerindeki veya farklı muamelelere maruz kalmış hücrelerdeki protein seviyelerinin nicel karşılaştırmasını sağlayan ilave bazı yöntemler geliştirilmiştir. Her ne kadar bu yöntemlerin hassasiyeti ve doğruluğuyla ilgili problemler çözülmeyi beklese de kompleks protein karışımlarının "rastgele" kütle spektrometresi ile analiz edilmesi, hücre proteinlerinin sistematik analizi için güçlü bir yaklaşım sağlamaktadır.

Protein lokalizasyonunun geniş çaplı analizi

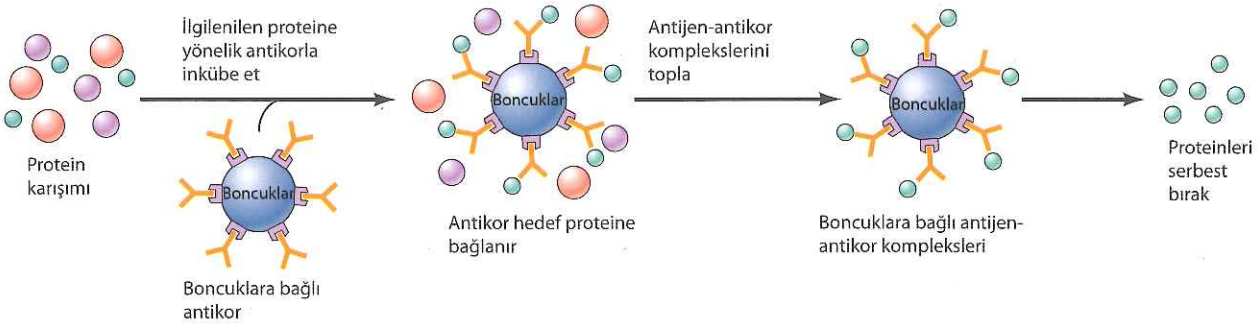
Ökaryotik hücrelerin işlevinin anlaşılması sadece herhangi bir hücre tipinde eksprese edilen proteinlerin tanımlanmasını gerektirmez, aynı zamanda bu proteinlerin hücre içindeki lokalizasyonlarının da karakterize edilmesini gerektirir. Bölüm 1'de gözden geçirildiği gibi, ökaryotik hücreler çekirdek ve pek çok organel içerirler. Bu organelellerin içinde bulunan proteinlerin sistematik analizi, hücre biyolojisinde proteomik yaklaşımların önemli bir amacıdır.

Pek çok organelin protein kompozisyonu, klasik hücre biyolojisi yöntemleriyle kütle spektrometresinin birlikte kullanımı sayesinde belirlenmiştir. Bölüm 1'de tartışıldığı gibi, ilgilenilen organeller, hücrelerden hücrealtı ayırma yöntemleri aracılığıyla izole edilir (bkz. Şekil 1.39 ve 1.40). İzole edilmiş organellerde bulunan proteinler daha sonra kütle spektrometresiyle belirlenebilir. Çeşitli organelin ve çekirdek gibi büyük hücre içi yapılarının proteomları bu yaklaşımla karakterize edilmiştir- bazı örnekler **Tablo 5.2**'de gösterilmiştir. Örneğin, kütle spektrometresi ile, saflaştırılmış mitokondrilerde 700'den fazla farklı protein ve lizozomlarda yaklaşık 200 protein tanımlanmıştır. Farklı dokulardan izole edilmiş hücrelerden veya farklı koşullarda büyümüş hücrelerden izole edilmiş organellerle yapılan bu tarz çalışmalarla, farklı hücre tipleri ya da farklı fizyolojik durumlarla ilişkili protein kompozisyon değişikliklerini belirlemek mümkündür.

Tablo 5.2 Hücresel yapıların protein bileşimi

Yapılar	Tespit edilen protein sayıları[a]
Plazma zarı	860-2000
Endoplazmik retikulum	140
Mitokondri	400-750
Lizozom	200
Sentrozom	114
Peroksizom	70
Golgi aygıtı	400

[a]Farklı hücre tiplerinden elde edilen proteinleri temsil eden sayı aralıkları.
Kaynak: J. R. Yates III et al., 2005. *Nature Rev. Mol. Cell Biol* .6: 702

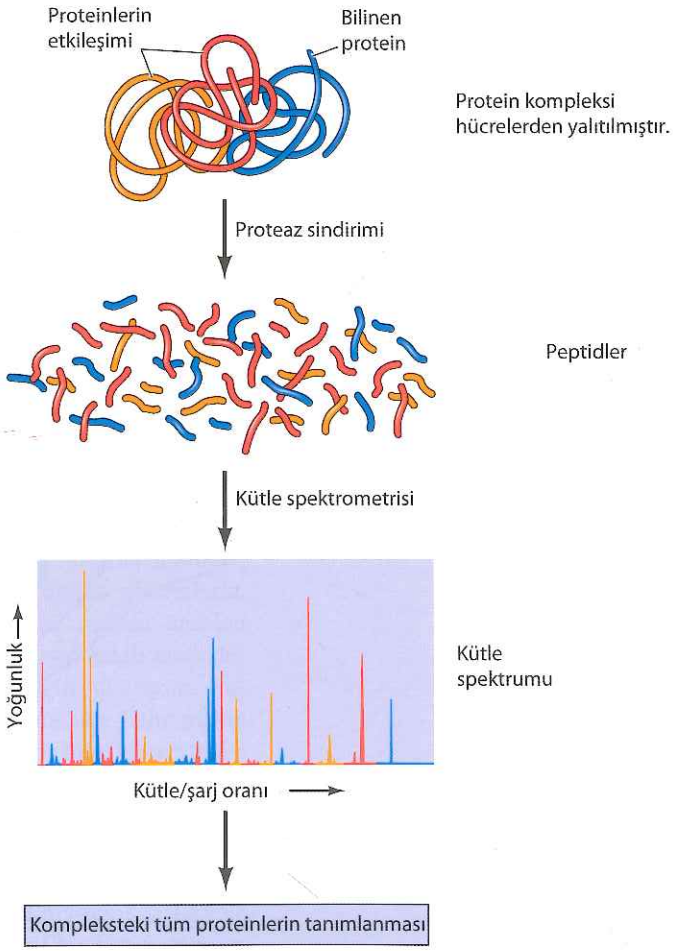


Şekil 5.11 İmmünçöktürme Bir hücre proteinlerinin karışımı, boncuklara bağlı bir antikorla inkübe edilir. Antikor, antijenine yöneldiği proteinlerle (yeşil) kompleksler oluşturur. Antijen-antikor kompleksleri boncuklar üzerinde toplanır ve hedef protein izole edilir.

Protein etkileşimleri

Proteinler nerdeyse hiçbir zaman hücre içinde tek başlarına hareket etmezler. Bunun yerine, genellikle, protein kompleksleri ve ağlar içinde diğer proteinlerle etkileşim kurarak görevlerini gerçekleştirirler. Proteinler arasındaki etkileşimlerin ortaya çıkartılması, özgün proteinlerin işlevi bağlamında bu yüzden önemli ipuçları sağlamanın yanısıra hücre davranışını yöneten karmaşık protein etkileşim ağlarının anlaşılmasına da yardımcı olmaktadır. Hücre içi yerleşimlerin detaylı çalışmalarıyla birlikte, protein kompleksleri ve etkileşimlerinin sistematik analizi, bu sebeple, proteomik analizin önemli amaçlarından biri haline gelmiştir.

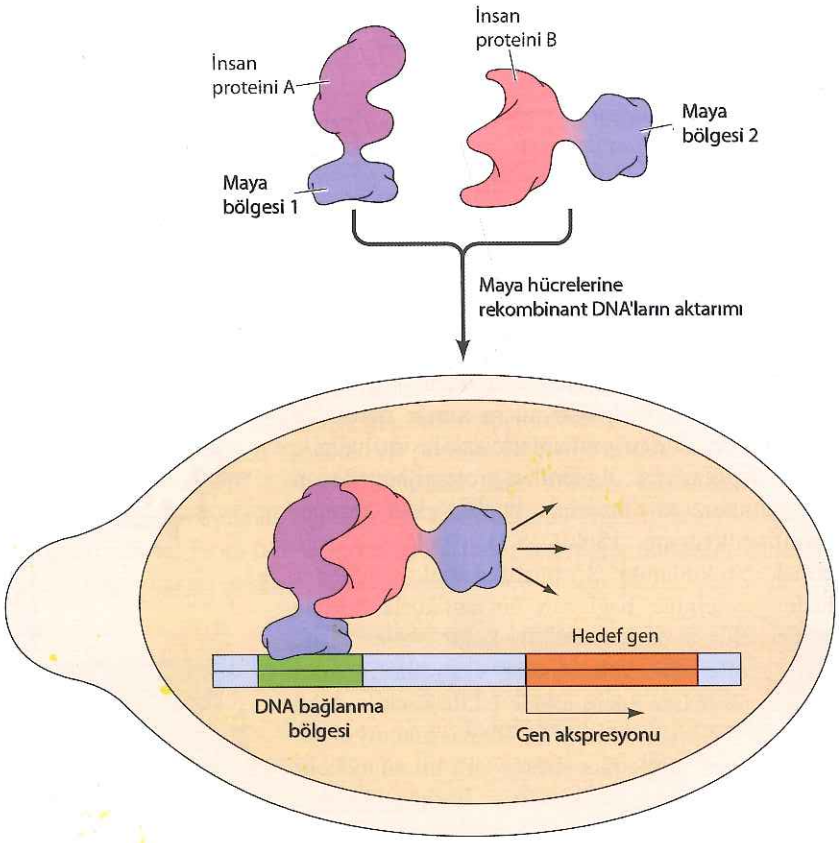
Protein kompleksi analizi yaklaşımlarından bir tanesi, bir proteini hücrelerden nazik koşullarda izole etmektir; böylelikle hücre içinde normalde etkileşimde olduğu proteinlerle etkileşim halinde kalır. Tipik olarak, ilgilenilen proteini hedefleyen bir antikor, o proteini hücre ekstraktından **immünçöktürme** (Şekil 5.11) yoluyla izole etmek için kullanılır. Bir hücre ekstraktı, antijenik hedef proteinine bağlanan bir antikorla inkübe edilir. Oluşan antijen-antikor kompleksleri daha sonra izole edilebilir. Hücre ekstratları, hedef protein normalde hücre içinde etkileşimde olduğu proteinlere bitişik kalacak şekilde hazırlandıysa, bu etkileşimdeki proteinler daha sonra immünçökelti içinde de bulunacaklardır. İmmünçöktürme uygulanmış bu protein kompleksleri, sadece antikorun yöneldiği protein değil, onun hücre



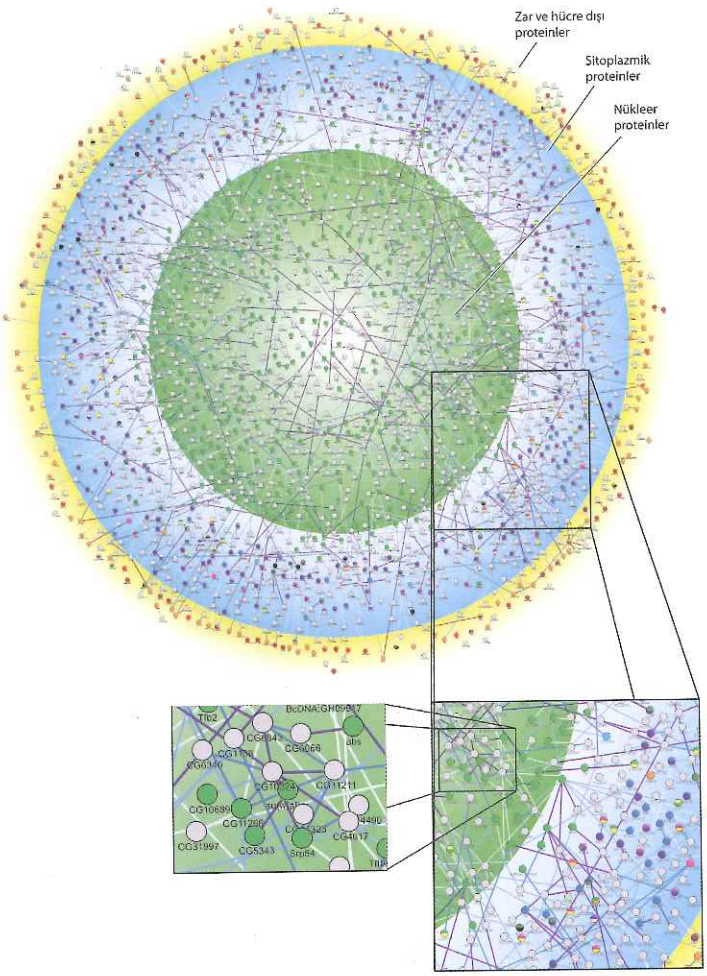
Şekil 5.12 Protein komplekslerinin analizi Bilinen bir protein (mavi), etkileşimde olduğu diğer proteinlerle birlikte (sarı ve kırmızı) hücrelerden bir kompleks olarak izole edilir. Bütün kompleks, etkileşimdeki proteinlerin belirlemek için kütle spektrometrisi ile analiz edilebilir.

özütünde etkileşim halinde bulunduğu diğer proteinleri de tanımlamak için, örneğin kütle spektrometresi ile analiz edilebilir. (Şekil 5.12). Protein etkileşimlerinin analizine yönelik bu yaklaşım, farklı hücre tiplerinde ve farklı fizyolojik koşullar altındaki protein-protein etkileşimlerini karakterize etmek için kullanılmış olup, hücre sinyal iletimi veya gen ekspresyonu gibi işlemlerde rol alan proteinler arasındaki sayısız etkileşimin tanımlanmasını sağlamışlardır.

Protein komplekslerinin sistematik analizine yönelik alternatif yaklaşımlar, maya hücrelerine sunulan protein çiftleri arasındaki etkileşimleri belirleyen genetik taramalar yanısıra, *in vitro* protein etkileşim taramalarını içerir. Birbiri ile etkileşen proteinleri belirlemede maya genetiğinin basit yöntemleri kullanılabildiği için, klonlanan genlerin mayalarda ekspresyonu özellikle kullanılışlı olmaktadır. **Maya ikili-hibrid sistemi** (***yeast two hybrid system***) denilen bu tarz bir analizde, iki farklı cDNA (örneğin insan hücrelerinden) mayada hedef gen ekspresyonunu stimüle eden bir proteinin iki farklı domainine eklenirler (Şekil 5.13). Maya, daha sonra, iki protein arasındaki



Şekil 5.13 Maya ikili hibrid sistemi İki insan proteininin cDNA'sı, hedef genin transkripsiyonunu stimüle eden bir maya proteininin iki bölgesiyle (1 ve 2 şeklinde belirtilmiş) füzyon olacak şekilde klonlanır. Bu iki rekombinant cDNA maya hücresinin içine sokulur. Şayet bu iki insan proteini birbirleri ile etkileşirlerse, maya proteininin iki bölgesini bir araya getirirler. Bölge 1 yukarı bir pozisyondaki hedef gen DNA dizisine bağlanır, ve bölge 2 hedef gen transkripsiyonunu uyarır. İki insan proteini arasındaki etkileşim, transforme olmuş mayadaki hedef genin ekspresyonu sayesinde belirlenir.



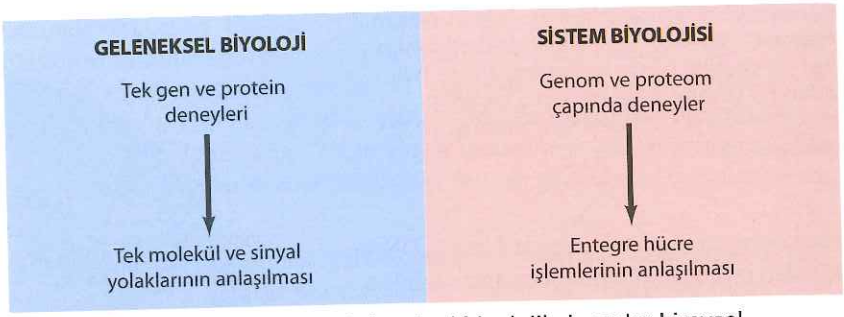
Şekil 5.14 ***Drosophila*'nın protein etkileşim haritası** 2346 protein arasındaki etkileşim, her bir protein hücre içi yerleşimini temsil eden bir çemberle gösterilmiş biçimde tasvir edilmiştir. (L. Giot'den alınmış. 2003 *Science* 302:1727)

etkileşimi incelemek amacıyla hibrid cDNA klonları ile transforme edilir. İnsan proteinleri şayet birbirleriyle etkileşime giriyorlarsa, maya proteinlerinin iki domainini biraraya getirmek suretiyle transfrome olmuş mayada hedef gen ifadesini uyarırlar. Hedef gen ekspresyonu, mayanın spesifik bir ortamda büyümesi veya mavi maya kolonisi üreten bir enzim üretimi yoluyla kolayca tespit edilebilir; böylelikle maya iki hibrid sistemi, protein-protein etkileşimlerinin testi için açık bir yöntem sağlar.

Yüksek çıktılı mayalı iki hibrid taramaları, *Drosophila*, *C. elegans* ve insanları da içeren yüksek ökaryotların proteinleri arasındaki etkileşimlerin sistematik taramalarına uygulanmıştır. Bu taramalar, hücredeki etkileşen proteinlerin oluşturduğu kapsamlı ağ yapılarının tasvir edildiği haritalar şeklinde sunulan binlerce protein-protein etkileşimi tanımlamıştır (Şekil 5.14). Bu protein etkileşim ağ yapılarının izah edilmesi, hücre düzenlenmesindeki kompleksliğin anlaşılmasının yanısıra, bugüne kadar tanımlanmamış olan proteinlerin işlevlerinin aydınlatılması konusunda da ileriye yönelik büyük bir adım olacaktır.

Sistem Biyolojisi

Genom dizileme projeleri biyolojideki pekçok probleme yaklaşma şeklinde, şimdilerde yaygın olarak kullanılan ve devasa veriler üreten sistemlerle, temel bir değişime sebep olmuştur. Tüm-genom dizileme sonucu üretilen devasa boyuttaki verilerin üstesinden gelmek, sofistike hesaplamalı analizler gerektirmekte olup; yeni bir alan olan **biyoinformatiğin** doğuşuna yol açmıştır. Bu alan, biyoloji ve bilgisayar bilimlerinin arayüzünde bulunmakta olup, milyarlarca baz DNA'nın dizisinden yararlı biyolojik bilgi çıkartılması ve analiz edilmesi için ihtiyaç duyulan bilgisayar programlarına dayalı yöntemlerin geliştirilmesine odaklanmaktadır. Global gen ekspresyonu ve proteomik analizi gibi büyük ölçekli diğer biyolojik deney türleri, benzer şekilde, geleneksel biyoloji deneylerinin çok ötesinde olan büyüklükte veri üretirler. Bu geniş ölçekli deneysel yaklaşımlar, karmaşık biyolojik sistem ve işlemlerin entegre olmuş dinamik davranışlarının kantitatif boyutta inceleyen **sistem biyolojisi** adındaki yeni alanın temelini oluşturmuştur. Geleneksel

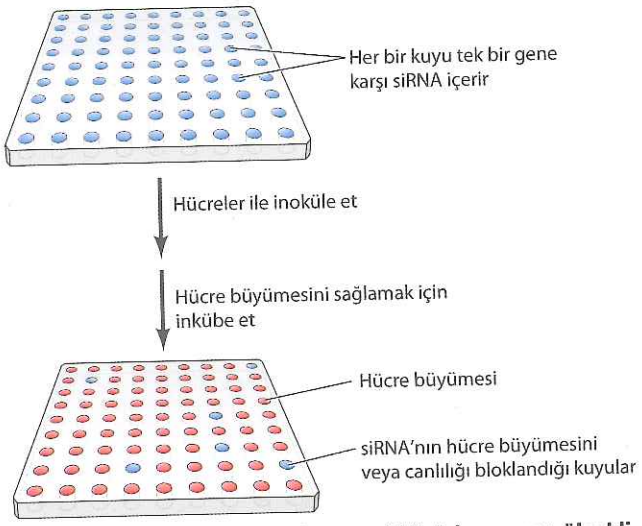


Şekil 5.15 Sistem biyolojisi Geleneksel biyolojik deneyler bireysel moleküller veya sinyal yolakları üzerine çalışırlar. Sistem biyolojisi global deneysel veriyi, entegre sistem ve işlemlerin hesaplamalı modellemesi amacıyla kullanır.

yaklaşımların aksine, sistem biyolojisi, kantitatif deneysel analiz ve modelleme için geniş ölçekli veri kümelerinin kullanımıyla karakterizedir (**Şekil 5.15**). Büyük ölçekli deney uygulaması, biyoinformatik ve sistem biyolojisine bağlı bazı araştırma alanları aşağıda tartışılmıştır.

Gen fonksiyonunun sistematik taraması

Bir organizmadaki bütün genlerin tanımlanması, gen işlevinin geniş ölçekli sistematik analizi için olanak sağlamaktadır. Yaklaşımlardan biri, genomdaki her geni, inaktif mutant aleliyle homolog rekombinasyon gerçekleştirerek sistematik olarak inaktive (ya da *knockout*) etmektir (bkz. Şekil 4.35). *E. coli*, maya, *Drosophila*, *C. elegans* ve *Arabidopsis thaliana*'yı da içeren pekçok model organizma için bütün bilinen genlerdeki mutasyonların ırk koleksiyonları mevcuttur. Bu mutant koleksiyonlar, hangi genlerin, ilgilenilen hangi biyolojik özellikte yeraldığının belirlenmesi amacıyla analiz edilebilirler. Sistematik olarak faredeki bütün genleri *knockout* edecek olan büyük ölçekli uluslararası bir proje devam etmekte olup, hedefli mutagenez 7000'den fazla genin işlevini ortaya koymuştur.



Şekil 5.16 Hücre büyümesi ve canlılığı için genom ölçekli RNAi taramaları Her bir kuyucuk bir gene karşılık gelen siRNA içerir. Doku kültürü hücreleri her bir kuyucuğa ekilir ve hücrelerin büyümesi için inkübe edilir. Hücrelerin büyümediği kuyucuklar hücre büyümesi ve canlılık için gerekli genleri tanımlarlar.

Alternatif olarak, RNA interferens (RNAi) temelli geniş ölçekli taramalar, *Drosophila*, *C. elegans* ve kültüre edilen memeli hücrelerini de içeren pekçok organizmada sistematik olarak gen işlevinin anlaşılması için kullanılmaktadır. RNAi taramalarında, hücrelerdeki homolog mRNA'ların degredasyonunu uyarmak için çift iplikli RNA'lar kullanılmaktadır (bkz. Şekil 4.38). Tüm genom dizilerinin mevcut olmasıyla, çift iplikli RNA dizi kütüphaneleri şimdi dizayn edilebilir ve yüksek ölçekli bir şekilde test edilebilecek herhangi bir biyolojik işlemde yeralan bütün genlerin tanımlanması amacıyla genom ölçekli taramada kullanılabilir. Örneğin, kültür ortamında genom boyu RNAi analizi, hücre büyümesi ve sağkalımı için gerekli olan genlerin tanımlanmasında kullanılabilir (**Şekil 5.16**). Genom boyu kütüphanedeki çift zincirli RNA'ların her biri, kültüre edilen hücrelerin büyümelerini engelleyip engellemediği, yüksek çıktı formatında mikrokuyucuklar içinde test edilir. Böylece, özel koşullar altında hücre büyümesi ve sağkalımı için ihtiyaç duyulan gen grupları karakterize edilir. Benzer RNAi taramaları, hücre sinyal iletim yolakları, protein

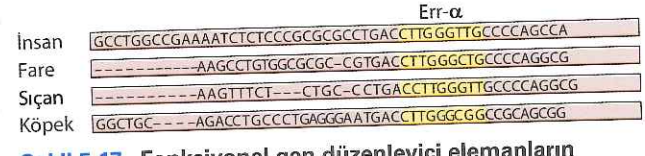
degredasyonu ve sinir sistemindeki sinapsler arasındaki iletişim de dahil olmak üzere pekçok biyolojik işlemde yer alan genleri tanımlamak amacıyla kullanılmışlardır. Çok yakın geçmişte, benzer şekilde, insan hücrelerindeki sağkalım veya anti kanser ilaçlarına dirençte rol alan gen gruplarının sistemetik olarak tanımlanması için CRISPR/Cas sistemini (bkz. Şekil 4.36) kullanan genom boyu taramalara başvurulmuştur.

Gen ekspresyonunun düzenlenmesi

Genom dizileri, prensip olarak, sadece genlerin protein-kodlayan dizilerini ortaya koymakla kalmaz, aynı zamanda gen ekspresyonunu düzenleyen dizileri de içerir. Sonraki bölümlerde tartışıldığı gibi, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, çok hücreli kompleks organizmaların gelişimi de dahil olmak üzere pekçok hücresel olay için kritik öneme sahiptir. Transkripsiyon ve alternatif kesip-çıkartma da dahil olmak üzere gen ifadesini konrol eden mekanizmaların anlaşılması, günümüz hücre ve moleküler biyolojisinde önemli bir girişimdir ve genom dizilerinin erişilebilir olması bu işe çok büyük katkı sağlamaktadır. Ne yazık ki, gen düzenleyici dizilerin tanımlanması protein-kodlayan dizilerin tanımlanmasından çok daha zordur. Düzenleyici elemanların çoğu, yaklaşık 10 baz çifti uzunluğundaki kısa DNA dizilerinden oluşur. Dolayısıyla, düzünleyici elemanlara benzeyen diziler genomda tesadüfen yüksek sıklıkta bulunurlar ve bu nedenle fizyolojik olarak anlamlı olan elemanlar sadece DNA dizisinden hareketle tanımlanamazlar. İşlevsel düzenleyeci elemanların tanımlanması ve gen ekspresyonunu kontrol eden sinyal ağ yapılarının ortaya konması, bu yüzden, biyoinformatik ve sistem biyolojisindeki temel güçlüklerden birini oluşturmaktadır.

Genom dizilerinin mevcut olması, bilim insanlarının, bir hücrede bütün genlerin ifadesinin eşzamanlı olarak test edilebildiği mikrodizinler veya RNA-*seq* (bkz. Şekil 5.6 ve 5.7) kullanarak büyük ölçek gen ekspresyon çalışmaları yürütebilmesini mümkün kılmıştır. Transkripsiyon profilinin belirlenmesi yönündeki bu tarz büyük ölçek çalışmalar, hücre farklılaşması veya hücrenin belirli bir hormon veya büyüme faktörüne verdiği yanıtı gibi farklı hücre davranışları ile ilişkili gen regülasyonundaki tüm değişiklikleri ortaya koyması açısından çok değerli hale gelmiştir. Bir hücre içinde koordineli bir şekilde düzenlenen genler benzer mekanizmalar yoluyla kontrol edileceklerinden, birçok genin ifadesindeki değişiklikleri analiz etmek, ortak düzenleyici elemanların yerinin belirlenmesine yardımcı olabilir. Dahası, zaman içinde meydana gelen gen ifadesindeki değişiklikler gen ekspresyon ağlarını ortaya çıkartabilir.

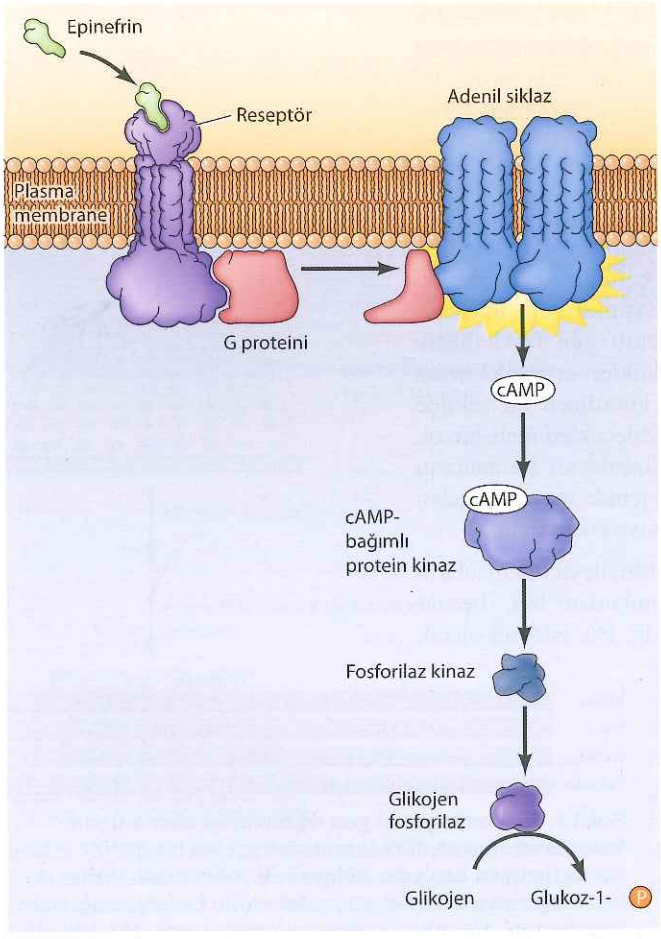
Çeşitli bilgisayar tabanlı işlemsel yaklaşımlar işlevsel düzenleyici elemanların karakterize edilmesinde kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlardan biri, benzer organizmaların genom dizilerinin karşılaştırmalı analizidir. Bu, işlevsel olarak önemli dizilerin, evrim sürecinde korunmuş olmasına rağmen, işlevsel olmayan DNA parçalarının daha hızlı farklılaştığı varsayımına dayanmaktadır. Memelilerde genom dizisinin yaklaşık %5'i korunmuştur: genomun ~%1.2'si protein-kodlayan diziye karşılık geldiğinden, geri kalan %4 işlevsel olarak önemli, düzenleyici dizileri temsil ediyor olabilir. Örneğin, insan, fare, sıçan ve köpek genomları arasında korunmuş olan kodlamayan dizilerin tanımlanması için yapılan işleme dayalı analizlerin, gen transkripsiyonunu kontrol eden dizilerin tarif edilmesinde yararlı oldukları gösterilmiştir (**Şekil 5.17**). Ek olarak, genlerin, genelde, pekçok transkripsiyon faktörünün



Şekil 5.17 Fonksiyonel gen düzenleyici elemanların korunumu İnsan, fare, sıçan ve köpekte bir genin transkripsiyon başlama bölgesinin yakınındaki diziler, transkripsiyon düzenleyici protein olan Err-α'ya bağlanan fonksiyonel düzenleyici eleman içermektedir. Bu diziler (sarı ile işaretlenmiş), dört genomun tamamında da korunmuş olmasına rağmen, çevrelerindeki diziler korunmamıştır. (After X. Xie et al., 2005. *Nature* 434:338)

etkileşimi aracılığıyla regüle edildikleri olgusunu yansıtacak biçimde, işlevsel düzenleyici elemanlar sıklıkla kümeler halinde bulunurlar (bkz. Bölüm 8). Genomik DNA üzerindeki transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinden oluşan kümeleri belirlemek üzere dizayn edilen bilgisayar algoritmalarının gen ekspresyonunu düzenleyen dizileri belirlemede de kullanılışlı olduğu kanıtlanmıştır.

Bölüm 8'de daha detaylı tartışıldığı gibi, düzenleyici proteinlerin bağlanma yerlerinin genom-boyu analizi amaçlı geniş ölçekli deneysel yaklaşımlar da geliştirilmiştir. Buna ilaveten, transkripsiyonel olarak aktif olan genlerle ilişkili spesifik histon modifikasyonları karakterize edilmiştir ve bu histon modifikasyon bölgelerinin genom boyu analizi, gen düzenleyici dizilerin geniş çaplı deneysel tanımlanmasını sağlayabilir. Bu global yaklaşımların uygulamaları, kompleks ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonu kontrolünün anlaşılmasında yeni bir pencere açmıştır. RNA-seq yaklaşımı ile transkribe olan bütün RNA'ları karakterize etmenin yanında büyük ölçek yöntemleri kullanarak 147 farklı tipte insan hücresinde gen düzenleyen dizileri belirleyen ve ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) olarak adlandırılan büyük ölçekli bir proje, bu konuda en göze çarpan örnektir. Bu global analizin sonuçları, sonraki bölümlerde tartışılacağı üzere, memeli genomlarının yapı ve işlevlerine bakış açımızı değiştirmiştir. En göze çarpan yanı, protein kodlayan diziler insan genomunun sadece yaklaşık %1'ine karşılık geldiği halde, genomumuzun %50'sinden fazlası üzerinden transkribe olan bu kodlamayan dizilerin çoğu gen düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

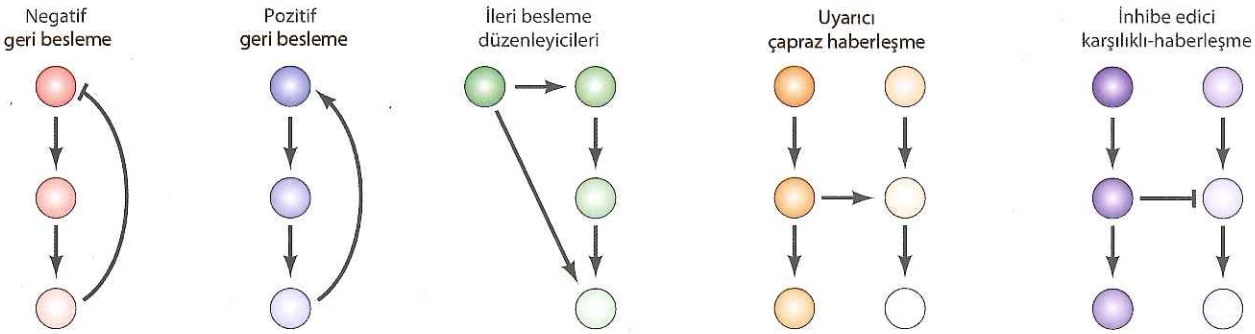


Şekil 5.18 Bir sinyal yolağı örneği Epinefrin (adrenalin)'in hücre yüzey reseptörüne bağlanması, glikojenin glukoz-1-fosfata indirgenmesine yol açan bir sinyal yolağını tetikler.

Ağlar

Klasik deneysel biyoloji, çoğu zaman bir sinyal yolağını oluşturan bir dizi reaksiyonu katalizlemek üzere ardışık olarak aktivite gösteren tek gen veya protein üzerine odaklanmıştır. Böyle reaksiyon serilerini içeren pekçok metabolik sinyal yolağı Bölüm 3'te tartışılmıştı. Örneğin glikoliz (glukozun pirüvata yıkılması), ardışık olarak görev yapan dokuz farklı enzim ile gerçekleştirilir. (bkz. Şekil 3.2). Sinyal yolakları, çevreden gelen bilgiyi hücre içindeki hedefe iletme bakımından, bir hormon varlığında olduğu gibi, benzer şekillerde gerçekleştirir. Örneğin, epinefrin hormonu, kas hücrelerindeki glukozon glikojene yıkılma sinyalidir (bkz. Şekil 2.30). Epinefrine verilen bu yanıt, altı farklı protein içeren bir sinyal yolağı aracılığıyla gerçekleştirilir (**Şekil 5.18**).

Özgün yolakların aktiviteleri, az sayıda gen ve proteinin klasik yöntemlerle analizi ile aydınlatılmıştır. Ne var ki, hücre içindeki sinyal iletimi bireysel yolakların aktitelerinden çok daha karmaşıktır. Metabolik veya sinyal iletim yolakları izole biçimde hareket etmezler; bunun yerine farklı yolaklar arasında kapsamlı bir çapraz iletişim (*crostalk*) bulunmaktadır ve çeşitli yolaklar hücrede

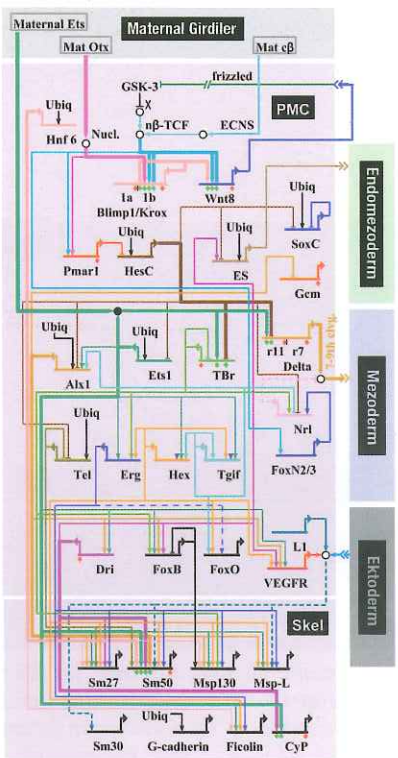


Şekil 5.19 Sinyalleşme ağ elemanları Geri besleme ilmiklerinde bir yolağın downstream elemanı, upstream elemanı ya inhibe eder (negatif geri besleme) veya uyarır (pozitif geri besleme). İleri besleme düzenleyicilerinde, bir yolağın akışyukarı elemanı, en yakınındaki hedefi ve daha aşağıdaki başka bir elemanının ikisini de uyarır. Bir yolağın elemanının, başka bir yolağın elemanını uyardığı veya inhibe etttiği zaman çarpraz-haberleşme meydana gelir.

ağlar oluşturacak şekilde birbirleriyle etkileşime girerler. Sistem biyolojisinin önündeki en önemli zorluk, hücrenin çevresine verdiği bu dinamik cevapları anlamak için gerekli olan, bu ağlarının bilgisayar ortamında modellenmesidir.

Yolakların ağ şeklinde bağlanabildikleri bazı yollar **Şekil 5.19**'da gösterilmektedir. Birçok yolağın aktivitesi **geribesleme döngüsü** ile kontrol edilir. Geribesleme döngüsünün bir örneği, metabolik yolakların geribesleme inhibisyonundan sağlanmıştır (bkz. Şekil 2.28). Negatif geribesleme ilmeklerine ek olarak, sinyal iletim ağları, pozitif geribesleme ilmekleri ve bir yolağın bir bileşeninin aktivitesinin uzak akış aşağı bir bileşeni uyardığı **ileri besleme düzenleyicileri** (***feedforward relays***) barındırabilirler. Bireysel yolaklar **çapraz ileti** (***crosstalk***) kurarak ağlar oluştururlar ve bu durum yolakların birbirleri ile etkileşimi olarak adlandırılır. Farklı yolaklar arasındaki çapraz iletişim pozitif (bir yolak diğerini stimüle eder) veya negatif (bir yolak diğerini inhibe eder) olabilir.

Hücre sinyalleşmesinin tamamının anlaşılması, en sonunda bir biyolojik cevapla sonuçlanan, birbirleri ile bağlantılı yolakların dinamik davranışlarını öngören ağ modellerinin geliştirilmesini gerektirecektir. Hücrenin entegre bir sistem olarak görüldüğü bu bakış açısında, problemin kompleksliğinin üstesinden gelmek için matematiksel modellere ve bilgisayar simülasyonlarına ihtiyaç duyulacağı açıktır. Örnek olarak, pek çok sinyal yolağı (Bölüm 16'da tartışılmıştır) en sonunda gen ekspresyonunu etkilemektedir. İnsan genomu bu yolaklarda görev alan 4000'in üzerinde protein kodlarlar ve bu elemanların kombinasyonlarının oluşturduğu yolaklar arasındaki çapraz regülasyon potansiyeli muazzam boyutlardadır. Geçtiğimiz günlerde geliştirilen deniz kestanesi embriyonik hücre nesil gelişiminden sorumlu bir gen düzenleyici ağ modeli, bu karmaşıklığın grafiksel bir temsilini sunmaktadır (**Şekil 5.20**). Açıkça, korkutucu boyutlarda bir iş olmasına rağmen, hücreyi entegre biyolojik sistem olarak gören matematiksel ve bilgisayar tabanlı yaklaşımlar hücre düzenleyici ağların kantitatif olarak anlaşılması, hücre biyolojisi araştırmalarında teknolojinin geldiği noktadaki kritik öneme sahip bir problemdir.



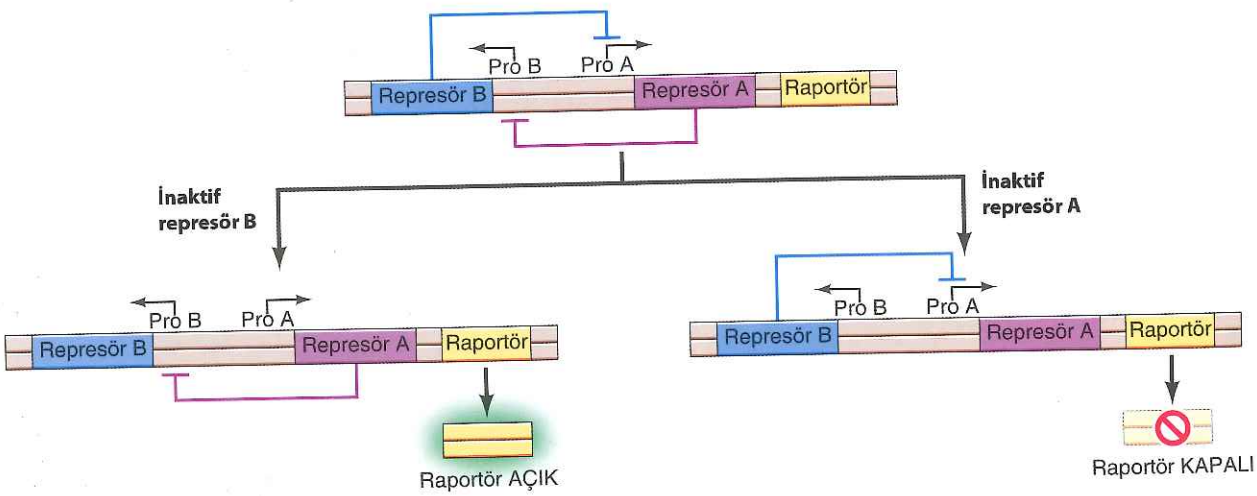
Şekil 5.20 Gen düzenleyici bir ağ Ağ, deniz kestanesinin iskelet hücrelerine farklılaşan embriyonik hücrelerin gelişimi için gerekli olan bütün düzenleyici genleri içerir. (P. Oliveri, Q. Tu ve E. H. Davidson 2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:5955 'den alınmıştır.)

Sentetik biyoloji

Sentetik biyoloji, biyolojik sistemlerin anlaşılması ve manipule edilmesi amacını taşıyan bir mühendislik yaklaşımıdır. Sentetik biyolojinin amacı, var olan (doğal) biyolojik sistemleri çalışmak yerine, yeni (doğal olmayan, sentetik), sistemler dizayn etmek ve yaratmaktır. Sentetik biyologlar, böyle yeni sistemler dizayn ederek, sadece yararlı ürünler yaratmayı ummakla kalmazlar aynı zamanda var olan hücrenin davranışının nasıl kontrol edildiğini daha iyi anlamayı da umarlar.

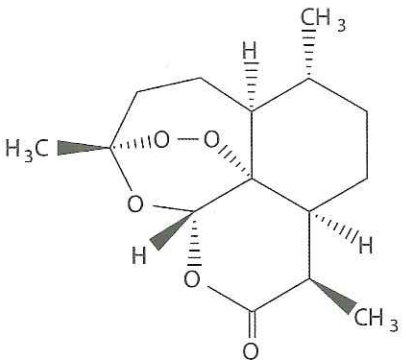
Sentetik biyologlar tarafından izlenen yaklaşımlardan biri, biyolojik özellikleri bulunan yeni moleküller sentezlemektir. Kendi kendine replikasyon özelliği bulunan RNA'ların sentezlenmesi, prebiyotik evrimde (bkz. Bölüm 1) RNA'nın kendi kendine replike olabilen ilk molekül olduğunun gösterilmesi açısından bir örnek teşkil ederler. Alternatif olarak, bir çok sentetik biyolog, varolan hücrelerin bileşenlerini farklı şekillerde bir araya gedirerek farklı fonksiyonel özellikler sergileyen yeni sistemler planlamaktadır. Sentetik biyolojinin mühendislik yaklaşımı, sadece yararlı işlevleri olan biyolojik sistemlerin dizaynı açısından önemli değil, aynı zamanda, doğal olarak var olan hücrelerin anlaşılması sürecinde, sistem biyolojisinin analitik olarak değerlendirmesinde bütünleyicidir. Özgün bir biyolojik sistemi geliştirebilmek, doğal sistemlerin işlevini yöneten ilkeler üzerindeki anlayışımızı test ederek genişletir.

Sentetik biyologlar tarafından dizayn edilmiş ilk sistemler, 2000'li yıllarda James Collins ve Stanislas Leibler'in laboratuvarları tarafından *E. coli*'de tasarlanan genetik devrelerdi. Genetik geçiş şalter (*genetic toggle switch*) adı verilen bu sistemlerden biri, gen ifadesini düzenleyen bir ağa stabilite ve hafıza sağlamak üzere dizayn edilmiştir. Sistem üç adet gen içerir: kolaylıkla tespit edilebilen bir gen ekspresyon indikatörü kodlayan rapotör gen ve küçük molekül uyaranların eklenmesiyle inaktive edilebilen baskılayıcıları kodlayan iki düzenleyici gen (**Şekil 5.21**). Bu tasarlanmış devrenin kararlılığından sorumlu ana özellik, raportör genin yanısıra iki baskılayıcının (represörün) birbirinin ekspresyonunu da kontrol etmesidir. Represör A represör B'nin ekspresyonunu bloke eder ve represör B hem represör A'nın hem de raportör



Şekil 5.21 Bir genetik geçiş şalteri Devre, birbirine düzenleyen iki represör (A ve B) ve represör B tarafından kontrol edilen bir raportör kodlayan genleri içerir. (T. S. Gardner, C. R. Cantor ve J. J. Collins, 2000. *Nature* 403: 339.)

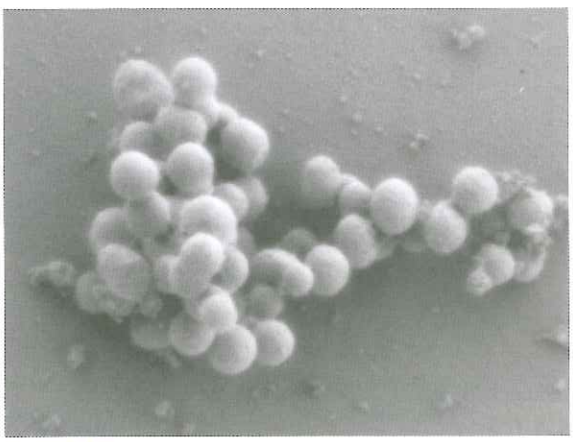
genlerinin ekspresyonunu bloke eder. Sistemin kararlılığının örneği olarak, represör B'yi inaktive eden küçük uyaran eklemenin etkilerini düşünün. Represör B'nin yokluğunda, hem raportör gen hem de represör B ifade edilir. Önemlisi, sistem, uyaran geri çekilse bile bu durumda kalacak, çünkü represör A, represör B'nin ekspresyonunu engellemeyi sürdürür. Diğer taraftan, represör A inaktive olursa, represör B ifade edilecek ve raportör genin yanısıra represör A'nın ifadesi sürekli olarak kapatılacaktır. Bu yüzden, sistem iki kararlı durum arasında değişebilir. Hem maya hem de memeli hücreleri içeren ökaryotik modellerde o zamandan beri benzer genetik devreler tasarlanmıştır. Bu sistemlerin tasarlanması, düzenleyici bir devrenin, sonraki bölümlerde açıklandığı gibi, hücre sinyal iletimiminin ve hücre proliferasyonu düzenlenmesinin birçok yerinde yer alan ağların ortak özelliği olan iki farklı durum arasında dönüşebilme konusundaki anlayışımızı büyük ölçüde ilerletmiştir.



Şekil 5.22 Artemisininin yapısı *P. falciparum* paraziti sonucu oluşan sıtmanın tedavisindeki en etkili tedavi, artemisinin ve diğer sıtma karşıtı ilaçların bir arada kullanılmasıdır.

Sentetik biyolojinin pratik uygulamaları verimli bir şekilde terapötik ilaçlar üretecek metabolik yolakların tasarımını içerir. Sıtma karşıtı ilaç olan artemisin üretimi bunlara iyi bir örnek teşkil etmektedir (**Şekil 5.22**). Sıtma, 200 milyondan fazla insanı etkileyen ve her yıl 600,000'den fazla insanın ölümüne neden olan genel bir sağlık problemidir. Çoğunlukla *P. falciparum* olmak üzere *Plasmodium* cinsine ait parazitlerin enfeksiyonu neticesinde meydana gelir. *P. falciparum* tarafından oluşan sıtma için en etkili tedavi yöntemi, diğer sıtma karşıtı ilaçlar ve artemisinin kombinasyonundan oluşan (artemisinin-kombinasyon tedavi veya ACT adı verilen) terapidir. Ne yazık ki, artemisinin, büyümesi yaklaşık sekiz ay süren bir bitki (tatlı pelin otu) tarafından üretilir ve tedariği değişken olup bu durum ürününün kıtlığına ve büyük fiyat dalgalanmalarına yol açmaktadır. Bu sorunu çözmek ve artemisininin botanik olmayan kaynaklarını üretmek için, Jay Keasling ve çalışma arkadaşları, daha sonra verimli bir şekilde, kimyasal bir işlemle artemisinine dönüştürülebilen artemisinik asiti yüksek miktarlarda üreten maya soyları tasarlamışlardır. 2013 yılında Sanofi adlı ilaç şirketi, bu yöntemle ilaç üretecek bir tesisin başlatılacağını anons etmiştir; ve 2014'ten bu yana 16 milyondan daha fazla tedavi gerçekleştirilmiştir.

Sentetik biyolojinin nihayi amacı, tamamen sentetik bir hücrenin oluşturulması olarak düşünülebilir. 2010 yılında tamamen sentetik bir genoma sahip ilk hücrenin oluşturulmasıyla bir dönüm noktasına erişilmişti. *Mycoplasma mycoides* genomunun bilinen 1.08 Mb'lik dizisiyle başlayarak Craig Venter ve arkadaşları tüm genom dizisine karşılık gelen üstüste geçen oligonükleotidler sentezlediler. Daha sonra bu sentetik nükleotidler, mayada plazmid şeklinde çoğalmak için gereken dizileri de içeren 1,077,947 bazlık tamamlanmış sentetik genom üretmek üzere pekçok adımda biraraya getirilmişlerdir. Sentetik genom, mayada plazmid şeklinde çoğaltılmış ve daha sonra gen transfer yöntemleriyle *M. capricolum* adı verilen farklı bir mikoplazma alt türüne yerleştirilmiştir. Sentetik genom içeren hücreler tetrasiklin direnciyle seçilmiş ve kültürde çoğaltılmışlardır. Genomlarının dizilenmesi tamamen sentetik *M. mycoides* DNA'sından türediklerini göstermiştir ve sentetik genoma sahip hücrelerin normal bir şekilde büyüdükleri ve normal *M. mycoides* morfolojisinde oldukları gözlemlenmiştir (**Şekil 5.23**). Bu yüzden mikoplazma tamamen senetik genoma sahip ilk hücreleri temsil eder.



Şekil 5.23 Sentetik bir genomu olan ilk hücre Sentetik bir genoma sahip *M. mycoides*'in taramalı elektron mikroskobik görüntüsü. (D. G. Gibson'dan alınmıştır, 2010. *Science* 329: 52.)

Hücresel proteinlerin hepsi o genom tarafından belirlendiği için, orijinal alıcı hücrede bulunan proteinler replikasyonla

Moleküler Tıp

Sıtma ve Sentetik Biyoloji

Hastalık

Sıtma, enfekte olmuş sivrisineklerden geçen bir parazit yüzünden oluşur ve insan parazit hastalıkları arasında en önemlisidir. Semptomları gribe benzemekte olup; şiddetli üşümeler, kusma ve yüksek ateştir.Tedavi edilmediği takdirde ciddi komplikasyonlar ve ölümle sonuçlanabilir. Dünya Sağlık Örgütü, 2013 yılında 198 milyon sıtma vakası ve %90'ı Afrika'da olmak üzere sıtmaya bağlı 584,000 ölüm olduğunu tahmin etmektedir.

Moleküler ve Hücresel Temel

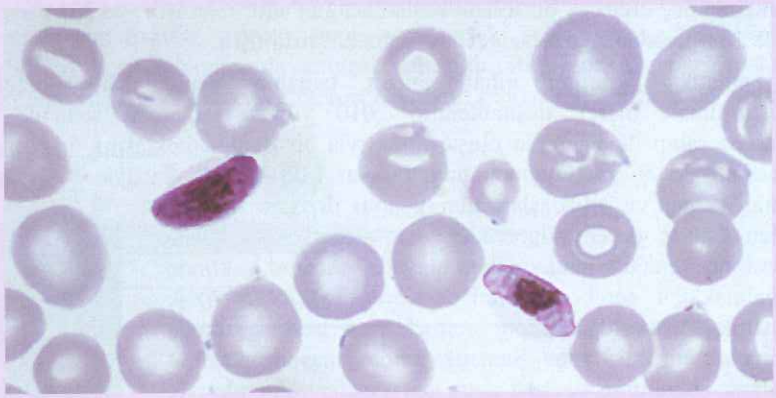
Sıtma hastalığına neden olan parazitler, Plozmodium cinsine ait protozoalardır. Beş tür, *P. falciparum, P. malariae, P. ovale, P. vivax* ve *P. knowlesi* insanlarda sıtmaya neden olur. Vakaların yaklaşık %75'ine ve ölümlerin neredeyse tamamına *P. falciparum* (bkz. şekil) neden olmaktadır. Hastalık, bir Anofel sivrisineğinin ısırığı ile bulaşır. Parazit daha sonra karaciğere geçer ve karaciğer hücrelerinde, binlerce yavru üretecek şekilde replike olur. Bu yavrular daha sonra enfekte ettikleri alyuvarlar içinde replike olurlar ve alvuarı parçalayarak ortama salınırlar. Bu parçalanma sonucu daha çok parazit salınır ve bu parazitler diğer alyuvarları enfekte edip, replike olurlar. Kan aşaması parazitleri, hastalığın semptomlarına neden olurlar ve bir sivrisinek tarafından sonraki enfeksiyonlar için alınabilirler.

Önlem ve Tedavi

Sıtmaya karşı aşı geliştirilmesi, temel bir halk sağlığı araştırma önceliğidir; ancak sıtma karşıtı bir aşı henüz mevcut değildir. Bunun yerine; hastalık önlenmesindeki uğraşlar; böceksavar kullanma, sivrisinek ağları altında uyuma, insektisit spreyleri gibi sivrisinek ısırmasını önleyecek tedbirler üzerine odaklanır. Sıtmanın yaygın olduğu yerlere yolculuk eden kişiler, tedavi esnasında da kullanılan farklı sıtma karşıtı ilaçlar alabilirler. Ne var ki, bu ilaçlar yoluyla önlem, sıtmanın varolduğu alanların yerlileri için maaliyet ve uzun süreli kullanımdan doğan yan etkileri nedeniyle pratik değildir. Sıtma için ilk etkili tedavi, 1940'larda kloroquine ile yer değiştirmiş olan quinin idi. Ne yazık ki, kloroquine dirençli *P. falciparum* türleri 1950'lerde gelişti ve şimdilerde yaygın hale geldi. *P. falciparum* için en etkili güncel tedavi Çinli bilim insanı Tu Youyou tarafından 1970'lerde keşfedilen Artemisinin'dir.

Artemisin dirençli *P. falciparum* türünün gelişmesini önlemek için, diğer sıtma ilaçları ile kombine tedavi uygulanır.

Artemisinin, ne yazık ki, yıllık kısıtlı miktarda ilaç sağlayan *Artemisia annua* (peygamber Süpürgesi) yapraklarından keşfedilmiştir. Bitkilerin tam boyutlarına ulaşmaları yaklaşık sekiz ay sürer ve ulaşılabilirliğindeki kararsızlık nedeniyle, Artemisinin'in piyasa fiyatı son yıllarda on kattan daha büyük bir aralıkta dalgallanmıştır. Sentetik biyologların çalışmaları, kimyasal olarak etkin bir şekilde artemisinin'e dönüştürülebilen artemisik asiti yüksek seviyede üreten maya türleri geliştirerek bu problemin çözümüne önemli katkı sağlamıştır. Artemisinin'in geliştirilmiş bu maya aracılığıyla verimli bir şekilde üretimine dayanarak, farmasötik şirketi Sanofi, 2013 yılında artemisinin üretimine yönelik yeni bir üretim merkezi kurmuş ve 2014'ten bu yana 16 milyon tedavi gerçekleştirmiştir.



Kan yaymasında *P. falciparum*

Bilgi İçin

İlk maya sentetik kromozomunu tasarlayan ekip genellikle lisans düzeyindeki araştırmacılardan oluşuyordu.

seyreldiğinden, bu mikoplazmalar da ilk sentetik hücreleri temsil ederler. Bir ökaryotik hücre dizaynı için model teşkil edecek senetetik bir maya genomu tasarlanması, yürürlükte olan güncel uğraşlardandır. İstikrarlı olarak azalmakta olan DNA sentezleme maaliyeti düşünüldüğünde, bitki ve hayvan genomlarının tasarlanması olasılığı yakın gelecekte uygulanabilir girişimlerden de olabilecektir.

ÖZET

Genomlar ve Transkriptomlar

- ***Bakteri ve mayaların genomları:*** Bakteri genomları, DNA'nın yaklaşık %90'ını oluşturan protein kodlayan diziler bakımından oldukça yoğundur. *E. coli* genomu 4,6 x 10^6 baz çifti DNA'dan oluşur ve yaklaşık 4200 gen içerir. Dizilenmiş ilk ökaryot genom *S. cerevisia* mayasına aittir. *S.cerevisia* genomu yaklaşık 6000 gen içerir ve protein kodlayan diziler genomun yaklaşık %70'ine karşılık gelir.
- ***Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster ve Arabidopsi thaliana genomları:*** *C.elegans* genomu, genomun % 25'ine karşılık gelen yaklaşık 19,000 protein kodlayan gen içerir. *Drosophila* genomu, protein kodlayan diziler genomun sadece %10 kadarına karşılık gelecek şekilde yaklaşık 14,000 gen içerir. Bu türlerdeki gen sayıları, gen sayılarının bir organizmanın biyolojik karmaşıklığıyla basit bir biçimde ilişkilendirilemeyceğini göstermektedir. Aynı şekilde, çiçek açan küçük bir bitki olan *Arabidopsis thaliana* şaşırtıcı bir biçimde *Drosophila* veya *C. elegans*'tan daha yüksek bir sayı olan 26,000 kadar gen içerir. Yaklaşık 57,000 gen taşıyan elmayı da içine alacak şekilde, diğer bitki genomları da çok sayıda gen içerirler. Bu bitkilerdeki yüksek sayılardaki genler, gen sayısı ve organizmanın karmaşıklığı arasında ilişki olmadığını bir kere daha vurgulamaktadır. Bkz. **Video 5.1**
- ***İnsan genomu:*** İnsan genomu yaklaşık 21,000 protein kodlayan gen içerir. Bu sayı, *Drosophila* ve *C.elegans* gibi daha basit hayvanlarda bulunan gen sayısından çok da fazla değildir ve *Arabidopsis* ve diğer bitkilerde bulunanlardan daha düşüktür.
- ***Diğer omurgalıların genomları:*** Balık, tavuk, fare, sıçan, köpek, resus makakları, şempanzeler ve Neandartel genomları insan genomi ile önemli karşılaştırma imkanı sağlarlar. Bütün bu omurgalılar benzer sayıda gen içerirler.
- ***Yeni nesil dizileme ve kişisel genomlar:*** DNA dizileme teknolojisindeki muazzam ilerlemeler, bireysel genomların dizilerinin belirlenmesini şimdi mümkün kılmıştır. Bkz. **Animasyon 5.1.**
- ***Gen ekspresyonunun geniş çaplı analizleri:*** Bir hücrede eksprese edilen RNA'lar, DNA mikrodizinlerine hibridizasyon veya yeni nesil dizileme yoluyla büyük ölçekte analiz edilebilir. Bkz. **Animasyon 5.2.**

Proteomik

- ***Hücre proteinlerinin tanımlanması:*** Hücrelerin bütün proteinlerinin karakterizasyonu, proteomiğin temel hedeflerinden biridir. Kütle spektrometresi, izole proteinlerin ya da karışım içindeki proteinlerin tanımlanmasında kullanılabilecek güçlü bir araç sağlar.
- ***Protein lokalizasyonunun geniş çaplı analizi:*** İzole edilmiş hücre içi organeller, protein bileşenlerinin belirlenmesi için kütle spektrometrisi yardımıyla analiz edilebilir.
- ***Protein etkileşimleri:*** Hücrelerden protein komplekslerinin pürifikasyonu ve mayaların içine gönderilen proteinler arasındaki etkileşimlerin analizi, etkileşen proteinleri tanımlayabilir ve hücre davranışını düzenleyen karmaşık protein etkileşim ağlarını açıklayabilir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

açık okuma çerçevesi

yeni nesil dizileme

transkriptom, DNA mikrodizin, RNA-seq

proteomik, proteom, iki boyutlu jel elektroforezi, kütle spektrometresi, ardışık kütle spektrometresi

immünçöktürme, maya ikili hibrid sistemi

ÖZET

Sistem Biyolojisi

- ***Gen fonksiyonunun sistematik taraması:*** Genom dizileme projeleri, geniş ölçekli deneysel ve hesaplamalı yöntemleri hücre ve moleküler biyoloji araştırmalarına tanıttı. RNA interferens yoluyla yapılan genom boyutlu taramalar veya CRISPR/Cas sistemi, yüksek çıktılı formatta test edilebilecek herhangi bir biyolojik işlemde yer alan bir organizmada bulunan bütün genleri sistematik olarak belirleyebilir.

- ***Gen ekspresyonunun düzenlenmesi:*** Gen düzenleyici dizilerin belirlenmesi ve gen ekspresyonunu kontrol eden mekanizmaların anlaşılması, biyoinformatik ve sistem biyolojisindeki temel güçlüklerden biridir. Bu problemlere, gen ekspresyonunun genom boyu çalışılması, histon modifikasyonu ve düzenleyici protein bağlanması, işlevsel düzenleyici elemanların belirlenmesi için bilgisayar tabanlı yaklaşımların geliştirilmesi ile cevap aranmıştır.

- ***Ağlar:*** Hücredeki sinyal yolaklarının aktiviteleri, sinyal büyüklüğü ve süresini kontrol eden geribesleme mekanizmaları tarafından düzenlenirler. Farklı sinyal yolakları da birbirlerinin aktivitelerini düzenlemek için etkileşirler. Farklı sinyal yolakları arasındaki geniş çarpraz-etkileşim, hücre davranışını kontrol eden karmaşık sinyal ağlarının oluşumuna neden olur.

- ***Sentetik biyoloji:*** Sentetik biyoloji, yeni biyolojik sistemler dizayn etme amacıyla biyolojiyi anlamaya çalışan bir mühendislik yaklaşımıdır. Sentetik biyologlar tarafından dizayn edilen sistemler, genetik devreler, metabolik yolaklar ve sentetik genomlar içerirler.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

biyoinformatik, sistem biyolojisi

ağ, geribesleme ilmiği, ileri besleme düzenleyicisi, çapraz etkileşim

sentetik biyoloji

Atıf

Hücre

Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Sorular

1. Bir genomun DNA dizisindeki protein kodlayan diziler nasıl belirlenir?
2. İnsan genomunun protein kodlayan dizisini oluşturan kısmı maya genomununki ile nasıl karşılaştırılabilir?
3. İnsan genomundaki gen sayısı ile elmadaki gen sayısı nasıl karşılaştırılabilir?
4. Kütle spektrometresinin protein belirlenmesinde nasıl kullanılabileceğini açıklayınız.
5. Kanser ve normal hücrelerdeki mitokondrilerin protein kompozisyonunu nasıl karşılaştırabilirsiniz?
6. Protein-protein etkileşimi çalışmalarından immünçöktürme nasıl kullanılabilir?
7. Meme kanseri tedavisi için ilaçların geliştirilmesi için iyi hedef olabilecek genlerin belirlenmesinde RNA interferens yaklaşımı nasıl kullanılabilir?
8. Gen ekspresyon çalışmalarında yeni nesil dizilemenin nasıl kullanılabileceğini açıklayınız
9. Düzenleyici dizilerin belirlenmesinin protein kodlayan dizilerin belirlenmesinden neden daha zor olduğunu açıklayınız.
10. Doğal biyolojik sistemlerin anlaşılmasına sentetik biyolojinin nasıl katkı sağlayabileceğini açıklayınız.

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar (Her ana bölüm için en önemli derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Genomlar ve Transkriptomlar

Adams, M. D. and 194 others. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster. Science* 287: 2185-2195. [P]

Bentley, D. R. and 193 others. 2008. Accurate whole genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456: 53-59. [P]

Blattner, F. R. and 16 others. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1462. [P]

Collins, F. 2010. Has the revolution arrived? *Nature* 464: 674-675. [R]

Fleischmann, R. D., and 39 others. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496-512. [P]

Hawkins, R. D., G. C. Hon and B. Ren. 2010. Next-generation genomics: an integrative approach. *Nature Rev. Genet.* 11: 476-486. [R]

Holt, R. A. and S. J. M. Jones. 2008. The new paradigm of flow cell sequencing. *Genome Res.* 18: 839-846. [R]

Howe, K. and 171 others. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498-503. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-945. [P]

Levy, S. and 30 others. 2007. The diploid genome sequence of an individual human . *PLoS Biology* 5: e254. [P]

Lindblad-Toh, K. and 46 others. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438: 803-819. [P]

Mardis, E. R. 2011. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 470: 198-203. [R]

Metzker, M. L. 2010. Sequencing technologies-the next generation. *Nature Rev. Genet.* 11: 31-46. [R]

Mouse Genome Sequencing Consortium. 2002. Initial sequence and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520-562. [P]

Ozsolak, F. and P.M. Milos. 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Rev. Genet.* 12: 87-98. [R]

Pennisi, E. 2011. Green genomes. *Science* 332: 1373-1375. [R]

Prufer, K. and 40 others. 2012. The bonobo genome compared with the chimpanzee and human genomes. *Nature* 486: 527-531. [P]

Prufer, K. and 44 others. 2014. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature* 505: 43-49. [P]

Rat Genome Sequencing Project Consortium. 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428: 493-521. [P]

Rhesus Macaque Genome Sequencing and Analysis Consortium. 2007. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome. *Science* 316: 222-234. [P]

Rogers, J. and R. A. Gibbs. 2014. Comparative primate genomics: emerging patterns of genome content and dynamics. *Nature Rev. Genet.* 5: 347-359. [R]

Stegle, O., S. A. Teichmann and J. C. Mariani. 2015. Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics. Nature Rev. Genet. 16: 133-145. [R]

The 1000 Genomes Project Consortium. 2010. A map of human genome varia tion from population-scale sequencing. *Nature* 467: 1061-1073. [P]

The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815. [P]

The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018. [P]

The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. 2005. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* 437: 69-87. [P]

The ENCODE Project Consortium. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57-74. [P]

Venter, J. C. 2010. Multiple personal genomes await. *Nature* 464: 676-677. [R]

Venter, J. C. and 273 others. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351. [P]

Wheeler, D. A. and 26 others. 2008. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing . *Nature* 452: 872-876. [P]

Proteomik

Ahmad, Y. and A. I. Lamond. 2014. A perspective on proteomics in cell biology. *Trends Cell Biol.* 24: 257-264. [R]

Ahrens, C. H., E. Brunner, E. Qeli, K. Basler, and R. Aebersold. 2010. Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 789-801. [R]

Breker, M. and M. Schuldiner. 2014. The emergence of proteome-wide technologies: systematic analysis of proteins comes of age. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 453-464. [R]

Doman, B. and R. Aebersold . 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312: 212-217. [R]

Gavin, A.-C. and 37 others. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415: 141-147. [P]

Gingras, A.-C., M. Gstaiger, B. Raught and R. Aebersold. 2007. Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 645-654. [R]

Giot, L. and 48 others. 2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster. Science* 302: 1727-1736. [P]

Gstaiger, M. and R. Aebersold. 2009. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nature Rev. Genet.* 10: 617-627. [R]

Krogan, N . J. and 52 others. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. Nature* 440: 637-643. [P]

Walther, T. C. and M. Mann. 2010. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J. Cell Biol.* 190: 491-500. [R]

Yates, J. R. III., A. Gilchrist, K. E. Howell and J. J. M. Bergeron. 2005. Proteomics of organelles and large cellular structures. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 702-714. [R]

Sistem Biyolojisi

Annaluru, N. and 79 others. 2014. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science* 344: 55-58. [P]

Chuang, H.-Y., M. Hofree and T. Ideker. 2010. A decade of systems biology. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 26: 721-744. [R]

Einitski, L., V. X. Jin, P. J. Farnham and S. J. M. Jones. 2006. Locating mammalian transcription factor binding sites: a survey of computational and experimental techniques. *Genome Res.* 16: 1455-1464. [R]

Elowitz, M. B. and S. A. Liebler. 2000. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* 403: 335-338. [P]

Eungdamrong, N. J. and R. Iyengar. 2004. Computational approaches for modeling regulatory cellular networks. *Trends Cell Biol.* 14: 661-669. [R]

Gardner, T. S., C. R. Cantor and J. J. Collins. 2000. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli. Nature* 403: 339-342. [P]

Ge, H., A. J. M. Walhout and M. Vidal. 2003. Integrating 'omic' information: A bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet.* 19: 551-559. [R]

Gibson, D. G. and 23 others. 2010. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 329: 52-56. [P]

Janes, K. A. and D. A. Lauffenburger. 2013. Models of signalling networks-what cell biologists can gain from them and give to them. *J. Cell Science* 126: 1913-1921. [R]

Kirschner, M. W. 2005. The meaning of systems biology. *Cell* 121: 503-504. [R]

Kitano, H. 2002. Systems biology: A brief overview. *Science* 295: 1662-1664. [R]

Komili, S. and P. Silver. 2008. Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view. *Nature Rev. Genet.* 9: 38--48. [R]

Le Novere, N. 2015. Quan titative and logic modelling of molecular and gene networks. *Nature Rev. Genet.* 16: 146-158. [R]

Lienert, F., J. J. Lohmueller, A. Garg and P. A. Silver. 2014. Synthetic biology in mammalian cells: next generation research tools and therapeutics. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 95-107. [R]

Mohr, S. E., J. A. Smith, C. E. Shamu, R. A. Neumüller and N. Perrimon. 2014. RNAi screening comes of age: improved techniques and complem entary approaches. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 591-600. [R]

Nurse, P. and J. Hayles. 2011. The cell in an era of systems biology. *Cell* 144: 850-854. [R]

Oliveri, P., Q. Tu and E. H. Davidson. 2008. Global regulatory logic for specification of an embryonic cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 5955-5962. [P]

Paddon, C. J. and 49 others. 2013. High -level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* 496: 528-532. [P]

Papin, J. A., T. Hunter, B. O. Palsson and S. Subramaniam. 2005. Reconstruction of cellular signaling networks and analysis of their properties. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 99-111. [R]

Shalem, O., N. E. Sanjana and F. Zhang. 2015. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nature Rev. Genet.* 16: 299-311. [R]

Wang, T., J. J. Wei, D. M. Sabatini and E. S. Lander. 2014. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 343: 80-84. [P]

Wasserman, W. W. and A. Sandelin . 2004. Applied bioinf ormatics for the identification of regulatory elements. *Nature Rev. Genet.* 5: 276-287. [R]

White, J. K. and 30 others. 2013. Genome-wide generation and systematic phenotyping of knockout mice reveals new roles for many genes. *Cell* 154: 452-464. [R]

Xie, X., J. Lu, E. J. Kulbokas, T. R. Golub, V. Mootha, K. Lindblad-Toh, E. S. Lander and M. Kellis. 2005. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3′ UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434: 338-345. [P]

Zhu, X., M. Gerstein and M. Snyder. 2007. Getting connected: analysis and principles of biological networks. *Genes Dev.* 21: 1010-1024. [R]

KISIM II

Genetik Bilgi Akışı

Bölüm 6 **Genler ve Genomlar**

Bölüm 7 **Genomik DNA'nın Replikasyonu, Korunması ve Yeniden Düzenlenmesi**

Bölüm 8 **RNA Sentezi ve İşlenmesi**

Bölüm 9 **Protein Sentezi, İşlenmesi ve Düzenlenmesi**

BÖLÜM 6

Genler ve Genomlar

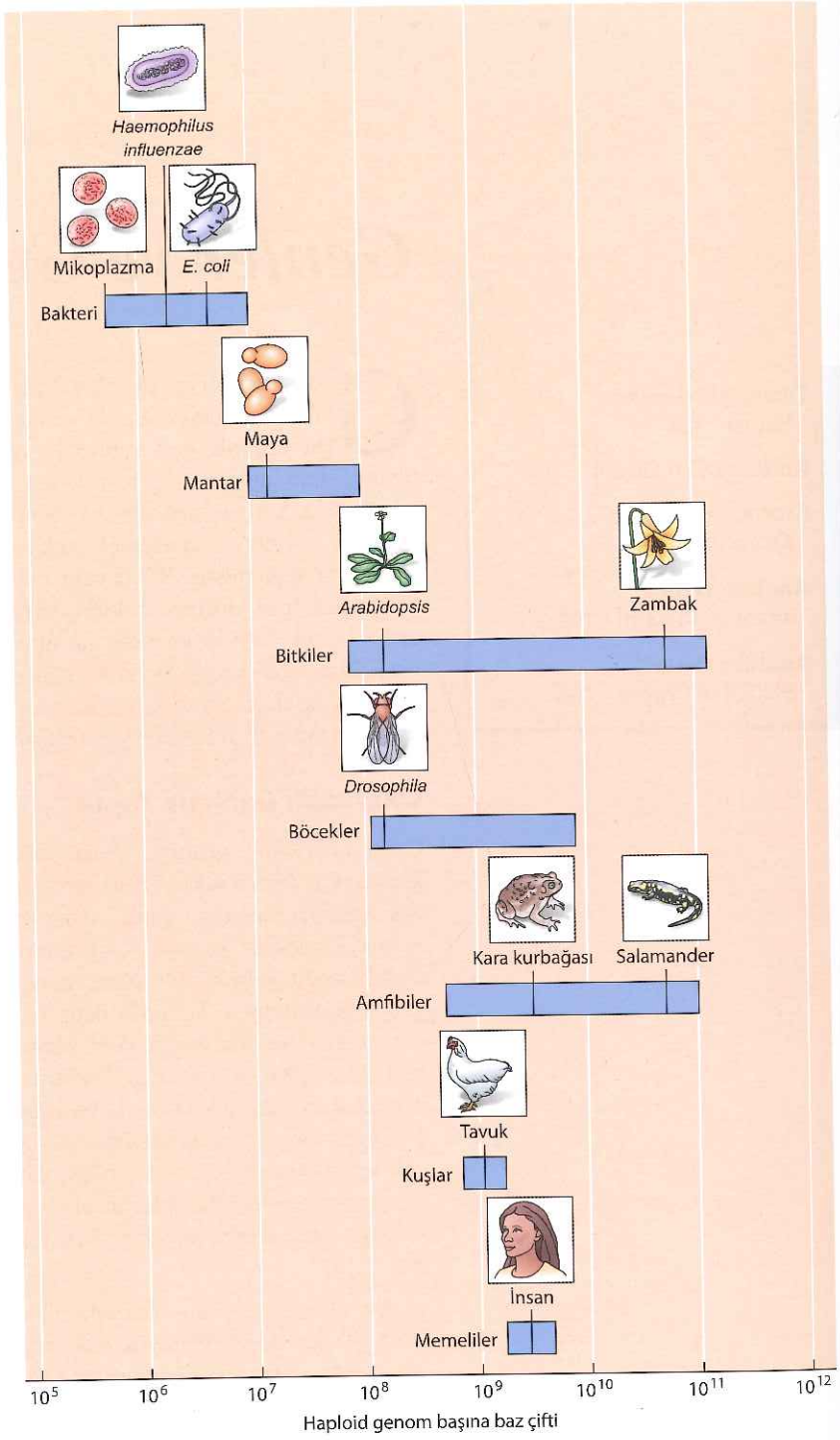
Ökaryotik Genlerin Yapısı 187
Kodlamayan Diziler 194
Kromozomlar ve Kromatin 203
Anahtar Deney İntronların Keşfi 190
Anahtar Deney ENCODE Projesi 195

Genetik materyal olarak DNA, tüm hücresel aktiviteleri yöneten ve çok hücreli organizmalarda gelişimsel planı belirleyen bir taslak oluşturur. Bu nedenle gen yapısı ve işlevinin anlaşılması hücrelerin moleküler biyolojisinin anlaşılması için temel şarttır. Gen klonlamanın gelişimi bilim adamlarına karmaşık ökaryotik genomları parçalarına ayırmak ve ökaryotik genlerin işlevlerini incelemek imkanını tanıyarak, bu yolda büyük bir adım atılmasını sağlamıştır. Bir önceki bölümde tartışıldığı gibi, DNA dizilemedeki gelişmeler bizi yüzlerce bakteri, maya, birçok bitki ve insan da dahil olmak üzere birçok hayvan genomunun tüm diziliminin bilinmesi gibi heyecan verici bir noktaya getirmiştir. Bu bölüm, ökaryotik genler ve birçoğu protein kodlamak yerine yüksek ökaryotların genomlarında gen düzenlenmesinde önemli roller oynayan dizi tipleri üzerine yoğunlaşacaktır.

Ökaryotik Genlerin Yapısı

Çoğu ökaryotun genomu prokaryotların genomundan daha büyük ve daha karmaşıktır (**Şekil 6.1**). Ökaryotik genomların büyüklüğünün daha fazla olması çok şaşırtıcı değildir, çünkü daha karmaşık organizmalarda daha fazla gen bulmayı bekleriz. Ancak, ökaryotların genom büyüklüğü genetik karmaşıklıkla ilişkili değil gibidir. Örneğin, semenderler ve zambak genomlarında insan genomundakinin 10 katından daha fazla miktarda DNA bulunmasına karşın, bu organizmaların insanlardan daha karmaşık olmadığı açıktır. Üstelik, Bölüm 5'de tartışıldığı gibi, ökaryotik genomlardaki gen sayısı ile genom büyüklüğü ya da biyolojik karmaşıklık arasında basit bir ilişki yoktur. Örneğin, insan genomu *E. coli* genomundan 1000 kat daha büyüktür ancak sadece 5 kat daha fazla sayıda gen içerir. Ayrıca, küçük bir bitki olan *Arabidopsis thaliana*'nın genomu insan genomunun sadece %5'i kadar olmasına rağmen, insan genomu 21,000 protein-kodlayan gen içerirken, *Arabidopsis thaliana* genomu 26,000 protein-kodlayan gen içerir.

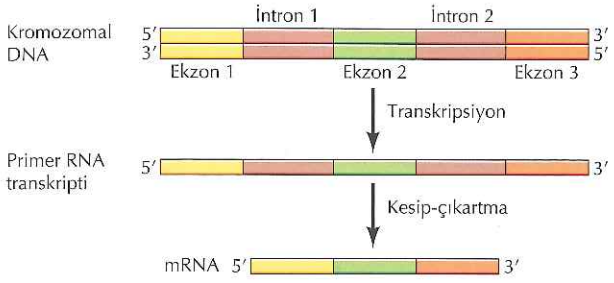
Bu çelişkiler, çoğu ökaryotik hücre genomunun sadece protein-kodlayan DNA dizileri değil de büyük miktarlarda protein-kodlamayan DNA içerdiğinin ortaya çıkartılması ile çözülmüştür. Ökaryotik genomların büyüklükleri arasındaki farklar temel olarak protein-kodlayan gen sayısı arasındaki farklılıklarından ziyade kodlamayan DNA miktarları arasındaki farkı yansıtır. Aşağıda tartışıldığı gibi, bu protein-kodlamayan dizilerin bazıları ökaryotik genlerin içinde yer alır. Protein-kodlayan genler arasındaki bölgelerde yer alan diğerleri ise bu bölümün bir sonraki kısmında tartışılacaktır. Bu diziler protein kodlamamasına rağmen, pek çok kodlamayan dizi hücrede kritik roller oynar, örneğin gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve genlerin farklı şekillerde eksprese olmasını sağlayarak genomlarımızın kodlama potansiyelini önemli ölçüde arttırmak gibi.



Şekil 6.1 Genom büyüklüğü Örnek bazı organizmaların genom büyüklük aralıkları logaritmik ölçekte gösterilmiştir.

İntronlar ve ekzonlar

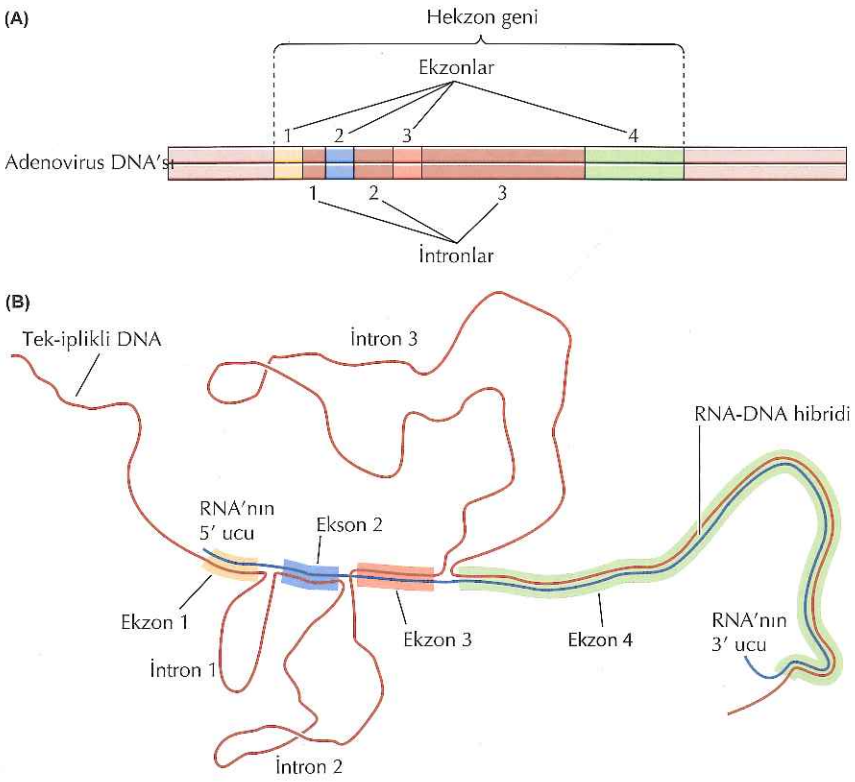
Moleküler olarak bir **gen,** bir RNA (örn., ribozomal veya transfer RNA) veya bir polipeptid olabilen işlevsel bir ürün oluşturacak şekilde eksprese olan bir DNA bölgesi olarak tanımlanabilir. Ökaryotlardaki kodlamayan DNA'nın bir kısmı genler arasında uzanan DNA dizileri iken, birçok ökaryotik gen de büyük miktarlarda kodlamayan DNA içerir. Bu tip genlerin kodlayan dizi bölgelerinin



Şekil 6.2 Ökaryotik genlerin yapısı Ökaryotik genlerin çoğu kodlayan dizi kısımları (ekzonlar) ve bunların arasında yer alan kodlamayan diziler (intronlar) içerir. Hem ekzonlar hem de intronlar transkripsiyona uğrayarak uzun bir primer RNA molekülünün oluşmasını sağlarlar. Daha sonra intronlar kesilerek çıkartılır (kesilip-eklenme ya da "*splicing*") ve olgun mRNA oluşur.

(**ekzonlar** adı verilir) kodlamayan dizilerden (aradaki diziler veya **intronlar**) ayrıldığı bölünmüş bir yapısı vardır (Şekil 6.2). Tüm genin uzun bir RNA molekülü oluşturacak şekilde transkripsiyonu yapılır, intronlar daha sonra kesilip-çıkartma (*splicing*) ve böylece mRNA'da sadece ekzonlar bulunur.

İntronlar ilk kez 1977'de, insan hücre kültürlerinde adenovirüs replikasyonunun incelendiği çalışmalarda, Phillip Sharp ve Richard Roberts'ın laboratuvarlarında, birbirinden bağımsız olarak bulunmuştur. Adenovirüs, gen ekspresyonunu çalışmak için kullanışlı bir modeldir, çünkü viral genom 3.5×10^4 baz çifti uzunluğundadır ve adenovirüs mRNA'sı enfekte hücrelerde yüksek düzeyde üretilir. Adenovirüs RNA'larını karakterize etmek için kullanılan yaklaşımlarda biri, RNA-DNA hibridlerini elektron mikroskobunda inceleyerek karşılık gelen viral genin yerleşimini saptamak olmuştur. RNA-DNA hibridleri tek iplikli DNA'dan ayırt edilebildiğinden, RNA transkriptlerinin bir DNA molekülü üzerindeki pozisyonu saptanabilir. Şaşırtıcı olarak, bu tip araştırmalar adenovirüs mRNA'larının viral DNA'nın tek bir bölgesine hibridize olmadığını ortaya çıkartmıştır (Şekil 6.3). Bunun yerine, tek bir mRNA molekülü viral genomun birbirinden ayrı birkaç bölgesine hibridize olmaktadır. Böylece, adenovirüs mRNA'sı kalıp DNA'nın kesintisiz transkriptine karşılık gelmemekte ve mRNA viral DNA'nın değişik kısımlarından köken alan, birbirinden ayrı birkaç dizi bloğundan oluşturulmaktadır. Bunun, daha sonra Bölüm 8'de detaylı olarak tartışılacak olan **RNA kesilip-çıkartılması (splicing)** aracılığıyla olduğu gösterilmiştir.



Şekil 6.3 Adenovirus mRNA'sında intronların keşfi (A) Adenovirüs hexon'unu (viral parçacığın önemli bir yapısal proteini) kodlayan gen dört ekzon ve bunların arasındaki üç introndan oluşur. (B) Bu şekil, hexon mRNA'sı ile adenovirüs DNA'sının bir kısmı arasındaki hipotetik hibridin elektron mikrografisini göstermektedir. Ekzonlar, tek iplikçikli DNA halkalarına karşılık gelen intronlar ile ayrılmış RNA-DNA hibrid bölgeleri olarak görülmektedir.

Anahtar Deney

İntronların Keşfi

Spliced Segments at the 5' Terminus of Adenovirus 2 Late mRNA

Susan M. Berget, Claire Moore, and Phillip A. Sharp
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA
***Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Volume 74, 1977, pages 3171-3175**

Bağlam

Moleküler klonlamadan önce, ökaryot hücrelerdeki mRNA sentezi hakkında çok az bilgi vardı. Ancak, bu olayın ökaryotlarda bakteride olduğundan daha karmaşık olduğu açıktı. Ökaryot mRNA'larının sentezi, hem transkripsiyona hem de primer transkriptlerin yapısını değiştiren işleme reaksiyonlarına gerek duymaktaydı. Daha da önemlisi ökaryot mRNA'ları öncelikle çekirdekte bulunan uzun primer transkriptler olarak sentezleniyor ve daha sonra da sitoplazmaya taşınan, çok daha kısa mRNA moleküllerine kesiliyor gibiydi.

Bu işleme basamaklarının genel olarak primer transkriptlerin 5' ve 3' uçlarından dizilerin çıkarılmasıyla ilişkili olduğu düşünülüyordu. Bu modelde, uzun primer transkript yapısındaki mRNA'lar bölünmemiş DNA dizileri tarafından kodlanıyorlardı. Bu ökaryot mRNA görüşü birbirinden ayrı olarak Berget, Moore ve Sharp, ve Louise Chow, Richard Gelinas, Tom Broker ve Richard Roberts tarafından, kesilip-eklenmenin tanımlanmasıyla önemli derecede değişti (*An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA, 1977. Cell 12:1-8*).

Deneyler

Kesip-ekleme mekanizmasını bulan her iki araştırma grubu, insan hücrelerinde mRNA sentezini araştırmak için temel avantajı, konak hücreden çok daha basit bir model olan adenovirus 2'yi kullandı. Viral DNA virüs partiküllerinden direkt olarak izole edilebilir ve viral yapısal proteinleri kodlayan mRNA'lar o kadar yüksek miktarlarda bulunur ki, enfekte hücrelerden direkt olarak saflaştırılabilir. Berget, Moore ve Sharp deneylerini, hekzon adıyla bilinen bir viral yapısal polipeptidi kodlayan ve çok miktarda bulunan bir mRNA üzerine odakladılar.

Viral genomda hekzon mRNA'sını haritalamak için saflaştırılmış mRNA adenovirus DNA'sına hibridize edildi ve hibrid molekülleri elektron mikroskobuyla incelendi. Beklendiği şekilde hekzon mRNA'sının ana kısmı adenovirus DNA'sının daha önce hekzon geni kapsadığı gösterilmiş kesim fragmanlarıyla hibridler oluşturdu. Ancak şaşırtıcı şekilde, hekzon mRNA'sının 5' ucundaki diziler, mesajın ana kısmını kodlayan DNA dizilerine komşu dizilerle hibridize olmadı ve bu da mRNA'nın 5' ucunun viral genomda başka yerlerde bulunan dizilerden kaynaklandığını düşündürdü.

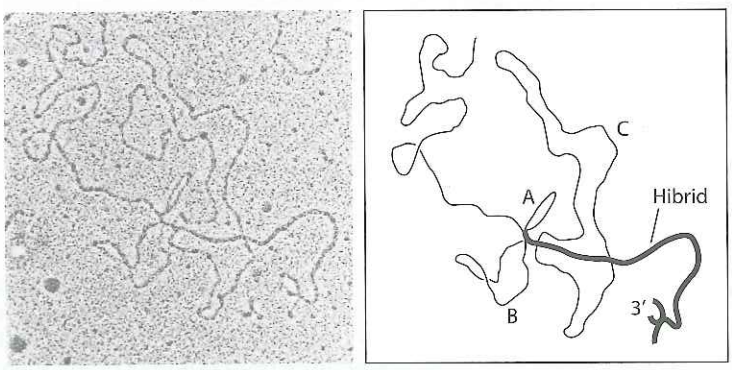
Bu olasılık hekzon mRNA'sının hekzon geninin yukarısında uzanan bir kesim fragmanına hibridizasyonu ile test edildi. Bu deneyde oluşan mRNA-DNA hibridleri karmaşık bir ilmik yapısı oluşturdular (Bkz. şekil). mRNA'nın ana kısmı daha önceden tanımlanmış hekzon DNA dizileriyle uzun bir hibrid bölgesi oluşturdu. Çarpıcı olan, hekzon mRNA'sının 5' ucunun, DNA'nın, birbirinden ve mesajın temel kısmından, büyük tek iplikçikli DNA ilmiklerle ayrılan, üç kısa yukarı bölgesine hibridize olmasıydı. Hekzon mRNA'sının 5' ucundaki diziler böylece, viral genomun üç ayrı bölgesinden transkribe oluyordu ve bunlar da, uzun primer transkriptin işlem görmesi esnasında mRNA'nın ana bölümüne ekleniyordu.

Phillip Sharp

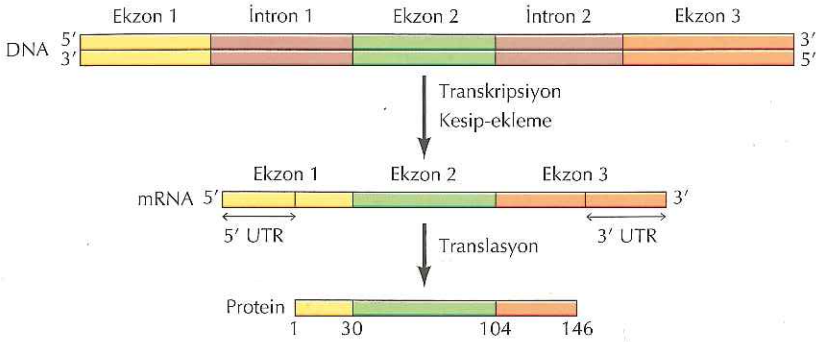
Richard Roberts

Etki

Adenovirüs mRNA'sında kesip-eklenme işleminin bulunmasını, hücresel mRNA deneyleri takip etti ve ökaryotik genlerin önceden beklenmeyen bir yapıda olduğu gösterildi. Kodlayan diziler sürekli değildi, aralarında intronlar mevcuttu ve bunlar kırpılma ile primer transkriptlerden çıkarılıyordu. Artık intronların, ökaryot genomdaki DNA'nın büyük kısmını oluşturduğu bilinmektedir ve intronların evrim ve gen ifadesinin düzenlenmesindeki rolleri, aktif araştırma konularıdır. Kesilip-eklenme işleminin bulunması, bu beklenmeyen RNA işleme reaksiyonunun mekanizması konusunda da büyük ilgi uyandırdı. Bölüm 8'de tartışıldığı şekilde, bu çalışmalar hem gen ifadesinin düzenlenmesi için yeni mekanizmaları ortaya çıkarttı, hem de RNA'nın yeni katalitik faaliyetlerini gösterdi ve evrimin erken dönemlerinin kendi kendini çoğaltan RNA moleküleriyle olduğu hipotezini destekleyen çok önemli deliller sundu. Adenovirus mRNA'larının beklenmeyen yapısı böylece hücresel ve moleküler biyolojinin farklı alanlarında büyük bir etki yaptı.



Adenovirüs DNA'sına hibridize edilmiş hekzon mRNA'sının elektron mikrografisi ve çizimi. A, B ve C olarak adlandırılmış tek iplikçikli ilmikler intronlara karşılık gelir.



Şekil 6.4 Fare β-globin geni Bu gen, kodlayan bölgesi üç ekzona bölen iki intron içermektedir. Ekzon 1 1-30 arası amino asitleri, ekzon 2 31-104 arası amino asitleri, ve ekzon 3 ise 105-146 arası amino asitleri kodlar. Ekzon 1 ve 3 ayrıca mRNA'nın, sırasıyla, 5′ ve 3′ uçlarında translasyona uğramayan bölgeler (TUB ya da UTR) içerir.

Adenovirüste intronların bulunmasından kısa bir süre sonra, ökaryot hücrelerin klonlanmış genlerinde benzer gözlemler yapılmıştır. Örneğin, RNA-DNA hibritlerinin elektron mikroskobuyla analizi ve daha sonra klonlanmış genomik DNA'lar ve cDNA'ların nükleotidlerinin dizilenmesi, fare β-globin geninin kodlayan bölgesinin (hemoglobinin β alt birimini kodlar) mRNA'dan kesilerek ayrılan iki intron ile bölünmüş olduğunu göstermiştir (Şekil 6.4).

Birçok ökaryot geninin intron-ekzon yapısı çok karmaşıktır ve intron dizilerindeki DNA miktarı sıklıkla ekzonlardakinden daha fazladır. Örneğin, ortalama bir insan geninde yaklaşık 10 ekzon (toplam 4.3 kb) bulunur, bunlar intronlar (toplam 52 kb) tarafından ayrılmıştır, ve böylece yaklaşık 56,000 baz çifti (56 **kilobaz**, veya **kb**) genomik DNA üzerine dağılmıştır (Tablo 6.1). Ekzonlar, mRNA'nın 5′ ve 3′ uçlarında yer alan ve protein yapısına katılmayan bölgeler (**5′ ve 3′ translasyona uğramayan bölgeler** ya da **UTR**) içerir. Bu kodlamayan ekzonların ortalama uzunluğu gen başına yaklaşık 2.6 kb iken protein kodlayan ekzon dizilerinin ortalama uzunluğu ise gen başına yaklaşık 1.7 kb'dir. Böylece, ortalama bir insan geninin sadece %3'ü protein kodlayan dizilerden oluşurken, yaklaşık %93'ü intronlardan oluşur.

İntronlar kompleks ökaryotlara ait genlerin çoğunda bulunurlar, ancak evrensel değillerdir. Örneğin, histon genlerinin hemen hemen hiçbirinde intron yoktur, yani intronlar ökaryot hücrelerinde gen işlevi için şart değildir. Tersine intronlar, genomlarının hemen tamamı (%90) protein kodlayan dizilerden oluşan prokaryotların sadece bazı nadir genlerinde mevcuttur. İntronların birçoğu hem bitkiler hem de hayvanlarda evrimsel olarak korunmuştur ki bu durum intronların

Tablo 6.1 Ortalama Bir İnsan Geninin Özellikleri[a]

Ekzon sayısı	10
Kodlayan dizi	1700 baz çifti
Toplam ekzon dizisi	4300 baz çifti
Intron dizisi	52,000 baz çifti

[a]Veriler "The ENCODE Project Consortium. 2012. *Nature* 489:57" den özetlenmiştir.

Tablo 6.2 Temsili Genomlardaki İntronlar

Organizma	Genom büyüklüğü (Mb)[a]	Gen sayısı	Protein-kodlayan dizi	İntronik dizi	Gen başına intron sayısı
Bakteri					
E. coli	4.6	4288	%88	NS[b]	NS
Mayalar					
S. cerevisiae	12	6000	%70	%1	0,04
Omurgasızlar					
C. elegans	97	19,000	%25	%25	5
Drosophila	180	13,600	%13	%10	4
Bitkiler					
Arabidopsis thaliana	125	26,000	%25	%25	5
Memeliler					
İnsan	3200	21,000	%1.2	%35	9

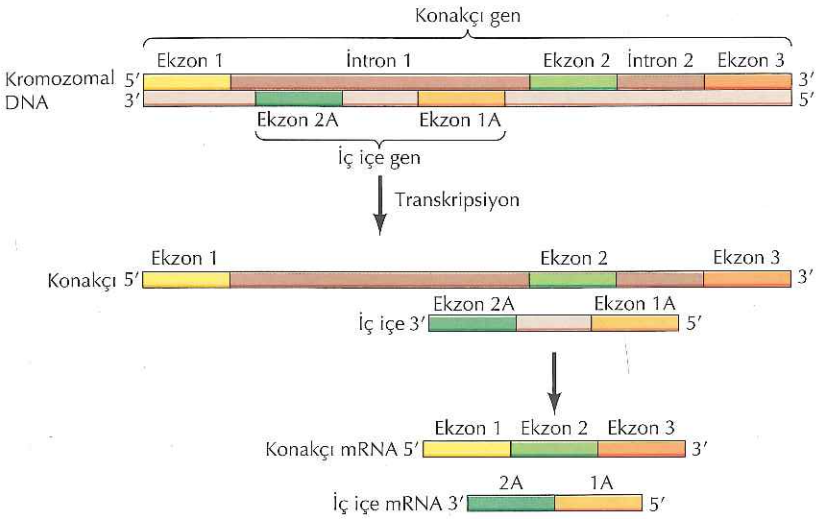
[a]Mb = milyon baz çifti
[b]NS = anlamlı değil

evrimin erken aşamalarında henüz bitki ve hayvanlar ayrışmadan önce ortaya çıktığına işaret etmektedir.

Ökaryotlarda, intronların sıklığı genom büyüklüğü ve karmaşıklığı ile paralel olarak artar (**Tablo 6.2**). Örneğin intronlar, 12 x 10^6 baz çiftinden oluşan ve 6000 protein kodlayan gen içeren *S. cerevisiae* maya genomundaki genlerin sadece yaklaşık %4'ünde bulunur. Dahası, intron içeren maya genleri genellikle gen başlangıcına yakın bir bölgede sadece küçük bir intron barındırır. Bu nedenle, mayalar prokaryotlara benzer biçimde sıkışık bir genoma sahiptirler ve protein kodlayan diziler maya DNA'sının yaklaşık %70'ini oluştururlar. Aksine, maya ve insan genomları arasında orta seviyede bir büyüklüğe sahip olan C. *elegans, Drosophila,* ve *Arabidopsis* genomları (yaklaşık 100 x 10^6 baz çifti) yine orta sayıda intron içerir. Bu organizmaların her biri gen başına ortalama 4-5 intron içerir ve intron dizi miktarı protein kodlayan dizi miktarına benzerdir. Böylelikle, bu organizmalardaki ortalama bir gen yaklaşık %50 intron ve %50 ekzon dizileri içerirken, intron dizileri tüm genomun %15-25'ini oluşturur. Yukarıda değinildiği gibi, ortalama bir insan geni ise %90 intron ve %10 ekzon dizilerinden oluşurken, intronlar tüm genomun yaklaşık %35'ini oluşturur.

İntronların rolleri

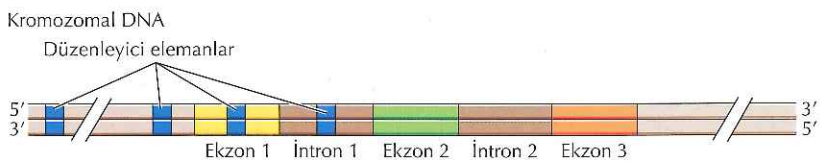
Her ne kadar intronlar olgun mRNA'dan kesilip çıkarılsalar da, intronların başka pek çok önemli biyolojik görevleri bulunmaktadır. İlk olarak, bir çok intron aslında fonksiyonel ürünler kodlar ki bunlar protein ya da kodlamayan RNA'lar olabilir. Bu durumlarda ("iç-içe genler" olarak bilinirler), bir gen daha büyük bir genin intronunda yer alır (**Şekil 6.5**). Daha büyük bir genin intronlarının protein kodladığı böyle iç-içe genler ilk olarak *Drosophila*'da tanımlanmıştır ve bu organizmada protein-kodlayan gen sayısının %5'inden fazlasını oluştururlar. İnsan genomunda iç-içe genler daha az sıklıkta görülür: yaklaşık 150 iç-içe protein kodlayan gen tanımlanmıştır ki bu sayı toplam gen sayısının %1'inden azdır. *Drosophila* ve insan genomlarındaki bazı iç-içe genler, psödogenler ve mikroRNA'lar ile ribozomal RNA işlenmesinde görev alan (sonraki bölümde tartışılacak) küçük nükleolar RNA'lar kodlar.



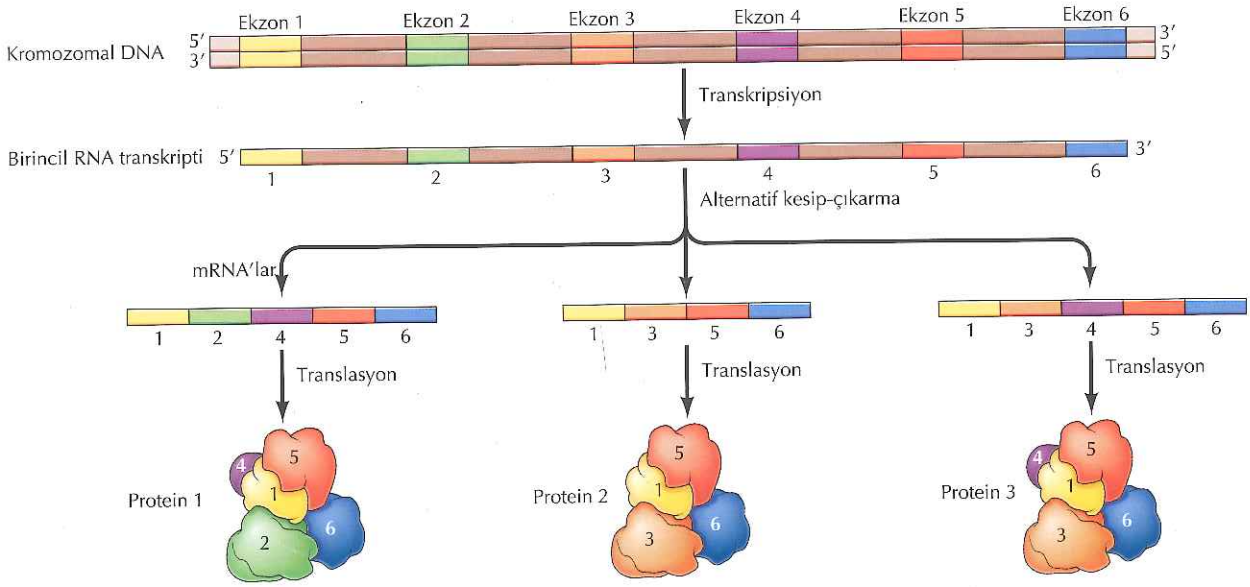
Şekil 6.5 İç-içe genler İç-içe bir gen daha büyük bir genin intronunda yer alır. Transkripsiyon hem konak hem de iç-içe genin primer transkriptlerini üretir ve bunların kırpılması ile konak ve iç-içe gen mRNA'ları ortaya çıkmış olur.

İntronlar ayrıca gen ekspresyonunu kontrol eden ve hücre davranışı için kritik olan düzenleyici diziler içerirler. Bir organizmadaki tüm hücreler aynı genlere sahip olduklarından, gen ekspresyonundaki düzenlenmiş farklılıklar bir hücrenin bir diğer hücreden farkını belirler: örneğin, bir insan beyin hücresi ile bir kas hücresi arasındaki farkı. Gen ekspresyonunun ilk basamağı olan transkripsiyon, farklı bölgelerde bulunabilen diziler tarafından düzenlenirler: genlerin yukarısında, genomda uzak bölgelerde ya da genlerin içinde (**Şekil 6.6**). Genlerin içinde bulunan transkripsiyonel düzenleyici dizilerin çoğu ya genin ilk intronunda, ya da ilk ekzon tarafından kodlanan 5′ translasyona uğramayan bölgelerin içinde yer alırlar. Büyük çaplı araştırmalar işaret etmektedir ki insan genomunun yaklaşık % 10-20'si gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan dizilerden oluşur; bu konu Bölüm 8'de tartışılacaktır.

Transkripsiyonu düzenleyen dizileri içermenin yanı sıra, intronlardaki diziler fonksiyonel mRNA'ların oluşumu için kritik öneme sahip olan kesilip-çıkarmayı düzenlerler. En önemlisi, intronların varlığı bir genin ekzonlarının farklı kombinasyonlarda bir araya getirilmesine olanak sağlar ve böylece aynı genden farklı proteinlerin sentezlenmesine yol açar.



Şekil 6.6 Transkripsiyonel düzenleyici elemanlar Bir genin transkripsiyonunu kontrol eden düzenleyici elemanlar genden yüzlerce kilobaza kadar uzakta, genin hemen yukarısında, kodlamayan ekzonların içinde ya da intronlarda yer alabilir.



Şekil 6.7 Alternatif kesilip-çıkartma Şekildeki gen altı ekzon ve onları ayıran beş intron içerir. Alternatif kesilip-çıkartma bu ekzonların farklı kombinasyonlarda bir araya gelmesine olanak tanır ve sonuçta tek bir primer transkriptten üç farklı mRNA ve protein ortaya çıkar.

Alternatif kesilip-çıkarma (Şekil 6.7) olarak bilinen bu süreç, karmaşık ökaryotların genlerinde sıklıkla gerçekleşir. Örneğin, insana ait genlerin çoğunluğu alternatif kesilip-çıkartmaya uğrayabilir ve en az iki, en çok ise binlerce farklı mRNA üretebilir. Ortalama olarak her bir insan geni 6 farklı alternatif kesilip-çıkarılmış mRNA üretir ve bunların 4'ü farklı proteinler kodlar. Alternatif kırpılma böylece 21,000 protein-kodlayan insan geninin neredeyse 85,000 farklı protein üretmesine imkan sağlar ve insan genomunun fonksiyonel repertuarını önemli ölçüde genişletir.

Kodlamayan Diziler

Protein-kodlayan genler, intronları da dahil olmak üzere, insan genomunun yaklaşık %36'sını oluştururlar. İnsan genomunun, ve diğer ökaryot genomlarının da, geri kalan kısmı çok sayıda farklı tip dizilerden oluşur. Bu diziler protein kodlamamalarına rağmen, son zamanlardaki araştırmalarda fonksiyonel oldukları ortaya konmuştur. Bu dizilerin rol ve aktivitelerinin tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, görünüşe göre pek çoğu gen düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır. Bazı diğerleri ökaryotik genomların evriminde anahtar rol oynamış, yine diğerleri ökaryotik kromozomların yapı ve replikasyonunda görev almaktadır. Yüksek ökaryotların genomlarının karmaşıklığı, protein-kodlayan gen sayısına kıyasla daha net biçimde bu kodlamayan dizilerin boyutu ve farklı aktivitelerine yansır; bu yüzden, kodlamayan dizilerin fonksiyonlarının ortaya çıkarılmasının, yüksek bitki ve hayvanların gelişim ve davranışlarını anlamamızda anahtar rol oynaması muhtemeldir.

Kodlamayan RNA'lar

İnsan genomundaki fonksiyonel elemanlara dair bilgilerimiz, 2012 yılında

Anahtar Deney

ENCODE Projesi

An Integrated Encyclopedia of DNA Elements in the Human Genome

The ENCODE Project Consortium
***Nature*, Volume 489, 2012, pages 57-73**

Bağlam

2004'te yayımlanan insan genom dizisinin şaşırtıcı bir sonucu (bkz. Anahtar Deney Bölüm 5) protein-kodlayan genlerin, o zamanki tahminle 20,000–25,000 gibi, düşük bir sayıda olmasıydı. Protein-kodlayan diziler genomun sadece %1.5'ini oluşturuyordu–öyleyse DNA'nın geri kalanı ne yapıyordu? Genomumuza dair 1980'li yıllardaki ilk düşüncelerimiz protein kodlamayan DNA'nın çoğunun fonksiyonel olmadığı yönündeydi. Bu görüşe göre genomun büyük kısmı "çöp DNA" olarak değerlendiriliyordu. Ancak, protein kodlamayan dizilerin de hücrede önemli roller oynayabileceği temeline dayanarak bu görüş sorgulanıyordu. ENCODE projesi 2003 yılında, insan genomundaki tüm fonksiyonel elemanların tanımlanması amacı ile başlatıldı. Genomumuzun ne kadarı herhangi bir fonksiyonu olmayan "çöp DNA"ydı, ne kadarının protein kodlama dışında önemli rolleri (örn. Gen düzenlenmesi) olabilirdi? ENCODE projesinin sonuçları, genomun çok büyük kısmının fonksiyonel olduğuna işaret ederken memeli genomuna, ve özellikle kodlamayan RNA'ların yaygınlığına, dair görüşlerimizi değiştirdi.

Deneyler

2003'te başlayan ENCODE projesinin ilk aşaması, genomun %1'ini analiz edecek bir pilot projeydi. Bu ilk aşamanın 2007'de yayımlanan sonuçları, yaklaşımın yapılabilirliğini ortaya koydu. DNA dizilemedeki ilerlemeler, özellikle de yeni nesil dizileme teknolojilerinin geliştirilmesi (Bölüm 5'de tartışıldı), projenin tüm genom analizini kapsayacak biçimde büyütülmesine olanak sağladı. ENCODE'un bu aşaması, dünya çapında 32 farklı merkezden 400'den farklı araştırmacının dahil olduğu muazzam bir uluslararası işbirliği ile gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar 147 farklı insan hücre hattındaki transkripsiyon ve düzenleyici dizileri genom çapında analiz etmek için çok sayıda farklı yöntem kullanmışlardır. Transkripsiyon ve RNA işlenmesi RNA-seq ile incelenmiş, gen düzenleyici bölgeler hem düzenleyici proteinlerin bağlanma dizilerinin hem de düzenleyici dizilere özgü kromatin karakteristik özellikleri taşıyan kromatin bölgelerinin belirlenmesi ile analiz edilmiştir. Farklı genler farklı hücrelerde eksprese olduklarından, 147 hücre hattından elde edilen sonuçlar bir araya getirilerek insan genomunda transkripsiyona uğrayan ve düzenleyici dizilerin tamamının belirlenmesi amaçlanmıştır.

ENCODE projesinin sonuçlarının bazıları tabloda özetlenmiştir. En çarpıcı bulgu, en az %80'i olmak üzere, neredeyse tüm genomumuzun bu genomik analiz yaklaşımı ile belirlenebilen bir fonksiyona sahip olduğudur. Genomun beklenmeyen büyüklükteki bir kısmı (yaklaşık %75) RNA'ya transkribe olmaktadır. Bu transkriptlerin kaynakları arasında ENCODE ile belirlenmiş 20,687 protein-kodlayan genin yanı sıra, 8801 kısa kodlamayan RNA, 9640 uzun kodlamayan RNA (lncRNA) ve 863 psödogen bulunmaktadır. Transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı DNA, genomun %8,1'ini oluşturmaktadır. Ancak, bu deneylerde sadece sınırlı sayıda transkripsiyon faktörü kullanılmış olması ve çok sayıda diferansiye hücre tipi bu 147 hücre tipi arasında yer almamış olması nedenleri ile bu rakamın gerçek değerinin altında olduğu, gen ekspresyonunu düzenleyen proteinlerin bağlandığı genom dizilerinin yaklaşık yarısına karşılık geldiği varsayılabilir.

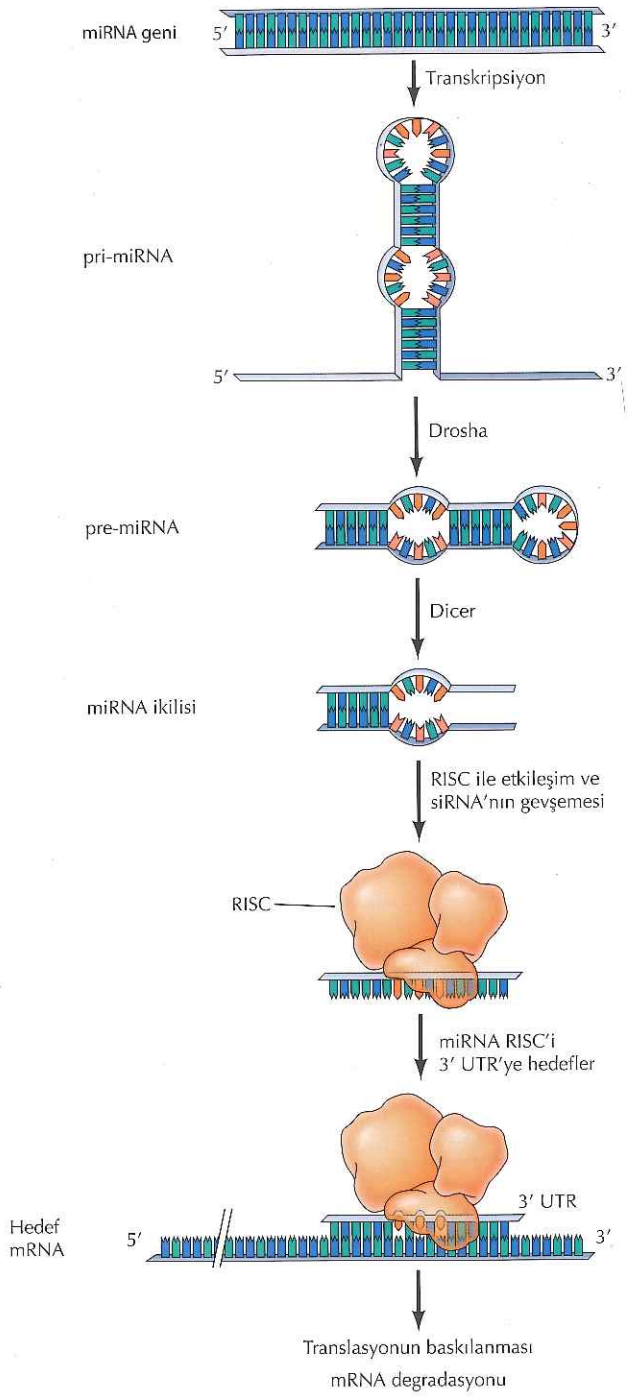
Etki

ENCODE en şaşırtıcı sonucu genomumuzun ne kadar büyük bir kısmının, en azından biyokimyasal aktivite düzeyinde, fonksiyonel olduğudur. Özellikle beklenmedik olan, kodlamayan RNA'ların transkripsiyonunun boyutu ve lncRNA'ları kodlayan çok sayıda gen bulunduğunun anlaşılmasıdır. Bu sonuçlar, genom hakkındaki düşünce biçimimizi değiştirmiştir. Genomumuzu, muazzam boyutta ve hiçbir fonksiyonu olmayan "çöp DNA"nın içine gömülmüş az sayıda protein-kodlayan gen dizisi olarak görmek yerine, artık öyle görünmektedir ki fonksiyonel diziler genomumuzun büyük kısmını oluştururken, kodlamayan RNA'lar ve gen düzenleyici diziler çok sayıda role sahiptir.

ENCODE tarafından belirlenen çok sayıdaki kodlamayan RNA'ların fonksiyonlarının anlaşılması, gelecekteki araştırmaların önünde bir zorluk olarak durmaktadır. Pek çoğunun gen transkripsiyonunu düzenleyici olarak görev yaptığı gösterilmiştir ancak, bu transkriptlerin çoğunluğunun fonksiyonları henüz anlaşılamamıştır. Bu yüzden, biyolojik olarak aktif elemanları ne ölçüde temsil ettikleri ve hücre davranışında oynadıkları roller tam olarak henüz bilinmemektedir. Benzer biçimde, genomumuzdaki gen düzenleyici bölgelerin tamamının aydınlatılması gelecekteki araştırmalar için bir hedeftir ve bunun için diferansiye hücrelerin tamamını kapsayacak biçimde daha da çok hücre tipinin analiz edilmesi gerekecektir. Anlaşılacak daha çok şey olmasına rağmen ENCODE, memeli gen ve genomlarına yeni bir bakış açışının temellerini atmıştır.

ENCODE Sonuçlarının Özeti

Protein-kodlayan genler	20,687
Kısa kodlamayan RNA'lar	8,801
Uzun kodlamayan RNA'lar	9,640
Psödogenler	11,224
Genomun RNA'ya transkribe olan kısmı	%74.7
Genomun transkripsiyon faktörü bağlayan kısmı	%8.1



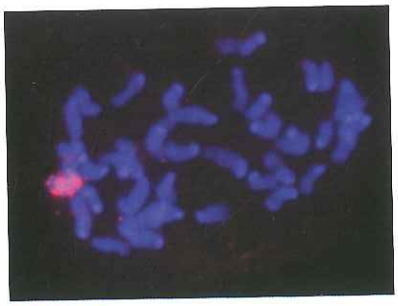
Şekil 6.8 miRNA'lar miRNA genleri transkripsiyona uğrayarak saç tokası yapıları barındıran birincil transkriptleri (pri-miRNA'lar) oluştururlar. Pri-miRNA'lar sırasıyla Drosha ve Dicer adlı nükleazlar tarafından kesilerek yaklaşık 22 nükleotidlik çift iplikli olgun miRNA'ları oluştururlar. miRNA'lar RISC kompleksi ile bir araya gelir ve miRNA'nın iki ipliği birbirinden ayrılır. Daha sonra miRNA, RISC'i hedef mRNA'nın 3′ translasyona uğramayan bölgesine (UTR) yönlendirir, böylece translasyonun baskılanması ve mRNA yıkımına neden olur.

büyük çaplı bir proje olan ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) sayesinde önemli ölçüde artmıştır. ENCODE projesinin amacı insan genomunda farklı tipteki dizilerin fonksiyonlarını tanımlamaktı. Bu projede 147 farklı hücre hattı, RNA'ya transkribe olan tüm dizilerin karakterizasyonunu amaçlayan büyük ölçekli RNA dizileme (RNA-seq, bkz. Şekil 5.7) de dahil olmak üzere çeşitli yöntemler aracılığı ile analiz edilmiştir. Bu kapsamlı analizin beklenmeyen bir sonucu, insan genomunun yaklaşık % 75'inin transkribe olduğuydu. Bu, genomun, protein-kodlayan genler ile açıklanabileceğinden çok daha büyük bir bölümüydü ve bu bulgular, kodlamayan RNA'ların gen düzenlenmesindeki yaygın rollerinin farkına varılmasına yol açtı. Transfer RNA'lar (tRNA) ve ribozomal RNA'lar (rRNA) gibi bazı kodlamayan RNA'lar uzun zamandır bilinmekte olup, protein sentezinde anahtar roller oynamaktadırlar (Bölüm 4'de tartışılmıştır). Sonraki bölümlerde tartışıldığı gibi, diğer kodlamayan RNA'lar pre-mRNA'ların kesilip-eklenmesinde ve ribozomal RNA'ların işlenmesinde görev alırlar. Önemli olarak, iki tip kodlamayan RNA yakın zaman önce keşfedilmiş olup, son yıllardaki en heyecan verici gelişmelerden bazıları bu RNA'ların gen düzenlenmesindeki önemlerinin anlaşılmasıyla ilgilidir. ENCODE projesinin sonuçları, kodlamayan RNA'ların, gen ekspresyonunun düzenlenmesini daha önce düşünüldüğünden çok daha ileri derecede gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır.

Bölüm 4'de tartışıldığı gibi, kısa çift-iplikli RNA'lar tarafından gerçekleştirilen **RNA interferens (RNAi)**, 1998'deki keşfinden bu yana gen ekspresyonunu translasyon seviyesinde engellemek için yaygın olarak kullanılan bir deneysel araç olmuştur (bkz. Şekil 4.38). Translasyonun kısa çift-iplikli RNA'lar tarafından düzenlenmesi sadece önemli bir deneysel yöntem olmayıp, aynı zamanda hücreler tarafından normal olarak mRNA translasyonu ve degradasyonunu kontrol etmek için kullanılır. RNA interferensini endojen olarak gerçekleştiren kodlamayan RNA'lar, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki **mikroRNA**'lardır (**miRNA**'lar). İnsan genomunda, bazıları protein-kodlayan genlerin intronlarında yerleşik, 1000 kadar miRNA bulunabilir. miRNA'ların öncülleri saç tokası biçiminde katlanan daha uzun RNA molekülleri olup, bu öncüller daha sonra sırası ile Drosha ve Dicer adlı nükleazlar tarafından kesilerek yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki çift-iplikli RNA'ları oluştururlar (**Şekil 6.8**). miRNA'nın bir ipliğinin RNA-ile-indüklenen susturucu kompleks (RISC)'e katılması ile miRNA RISC'i komplemanter mRNA'ya yönlendirir; bu

kompleks translasyonu engeller ve mRNA yıkımını uyarır. Tahmin edilmektedir ki her bir miRNA 100 kadar farklı mRNA'yı hedefleyebilir, böylece protein-kodlayan genlerimizin yaklaşık yarısı kadarı miRNA'lar tarafından düzenlenmenin hedefi olabilir. Biyolojik rolleri henüz tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, miRNA'ların erken embryonik gelişim, sinir sistemi, kas, kalp, akciğer, ve bağışıklık sisteminin gelişimi gibi çeşitli gelişimsel süreçlerde fonksiyonel oldukları gösterilmiştir. Ayrıca, miRNA'ların hücre çoğalması ve sağkalımı düzenledikleri gösterilmiş olup, anormal ekspresyonlarının kalp hastalığı ve çok sayıda farklı kanser gelişimine katkısı bulunmuştur..

miRNA'lara ek olarak, 200 nükleotidden daha uzun kodlamayan RNA'lar olan **uzun kodlamayan RNA**'ların (**lncRNA**'lar), ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonunun belli başlı düzenleyecileri arasında oldukları yakın zaman önce anlaşılmıştır. **X kromozom inaktivasyonu** fenomeni, lncRNA fonksiyonlarının ilk örneklerinden birisidir. İnsanlar da dahil olmak üzere pek çok hayvanda, dişiler iki X kromozomuna sahipken erkekler bir X ve bir Y kromozomuna sahiptirler. X kromozomunda, çok daha küçük olan Y kromozomunda bulunmayan yaklaşık 1000 kadar gen bulunur. Bu yüzden, X kromozom genlerininin çoğu dişilerde erkeklerdekinden 2 kat fazla kopya olarak bulunur. Bu farklılığa rağmen, X kromozomu genlerince kodlanan proteinlerin çoğunluğu erkek ve dişi hücrelerinde eşit miktarlarda bulunur. Bu durum, dişi hücrelerindeki iki X kromozomundan birisindeki genlerin çoğunun gelişimin erken evrelerinde bir ayarlaması telafi mekanizması tarafından susturulması sonucu ortaya çıkar. Bunun sonucunda, hem dişi hem erkek hücrelerinde X kromozomu genlerinden sadece birer kopya transkripsiyona uğrayabilir. X kromozom inaktivasyonunda kilit eleman, *Xist* olarak bilinen 17 kilobaz uzunluğunda bir lncRNA'dır. *Xist* RNA inaktif X'e bağlanarak transkripsiyonunu engeller (Şekil 6.9).



Şekil 6.9 X kromozom inaktivasyonu İnaktif X kromozomu lncRNA *Xist* (kırmızı) ile kaplanmış ve susturulmuştur. Kromozomlar DNA'ya (mavi) bağlanan bir boya ile boyanmıştır. (J.T. Lee, 2009. *Genes Dev.* 23: 1831'den alınmıştır.)

Xist gibi birkaç örnek daha önce biliniyor olsa da, lncRNA'ların memeli hücrelerindeki ekspresyonlarının boyutları, memeli genomlarının yoğun biçimde transkripsiyona uğradığını ortaya çıkarmış olan ENCODE projesi sonucunda anlaşılabilmiştir. İnsan hücrelerindeki RNA'ların yüksek-çıktılı en son dizilemesi, protein-kodlayan genler dışındaki transkripsiyon birimlerinin ürünü olan 50,000'den fazla lncRNA tanımlamıştır. Bölüm 8'de tartışılacağı gibi, son zamanlarda yapılan çalışmalar pekçok lncRNA'nın (*Xist* gibi) gen ekspresyonunun fonksiyonel düzenleyicileri olduğunu ortaya çıkarmıştır. ENCODE, ayrıca, çoğunun rolü henüz belirlenememiş olan neredeyse 9000 küçük kodlamayan RNA tanımlamıştır. Özellikle ilgi çekici olan, insan hücrelerinde bugüne kadar tanımlanmış olan kodlamayan RNA sayısının protein-kodlayan gen sayısından fazla olduğudur ki bu, kodlamayan RNA'ların yüksek ökaryot kompleksliğine önemli ölçüde katkıda bulunabileceğine işaret eder.

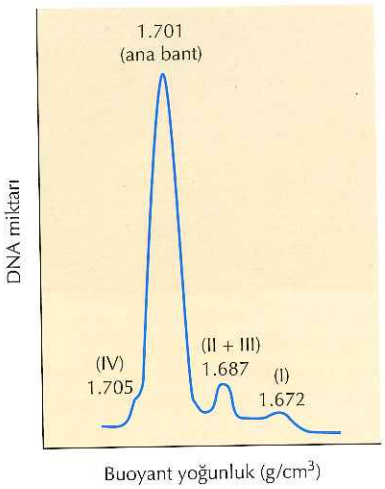
Tekrarlayan diziler

Kompleks ökaryot genomlarının büyük bir kısmı, genom başı yüz binlerce kopya olarak bulunabilecek yüksek tekrarlı DNA dizilerinden oluşur. Bu yüksek tekrarlı dizilerin çok sayıda farklı tipi bulunur (Tablo 6.3). Bir sınıf (**Basit-dizi tekrarları**), 1-500 nükleotidlik kısa tekrarların ardışık olarak dizilmiş binlerce

Tablo 6.3 İnsan Genomundaki Tekrarlayan Diziler

Dizi tipi	Kopya sayısı	Genomdaki oranı
Basit-dizi tekrarları[a]	> 1,000,000	~ %10
Retrotranspozonlar		
LINE'lar	850,000	%21
SINE'lar	1,500,000	%13
Retrovirüs-benzeri elemanlar	450,000	%8
DNA transpozonlar	300,000	%3

[a]Basit-dizi tekrarlarının miktarı insan genomundaki heterokromatinin oranından yola çıkarak tahmini olarak hesaplanmıştır.



Şekil 6.10 Satellit DNA *Drosophila* DNA'sının CsCl gradienti içinde denge santrifügasyonu, buoyant yoğunluğu (g/cm^3) 1.672, 1.687, ve 1.705 olan satellit DNA'yı (I-IV ile belirtilen) genomik DNA'nın ana bandından (buoyant yoğunluğu 1.701) ayırır.

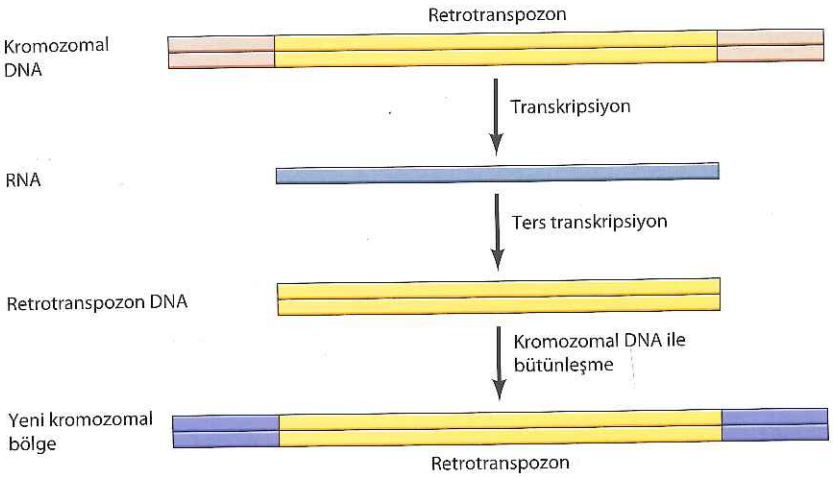
kopyasından oluşur. Örneğin, *Drosophila melanogaster*'deki bir basit-dizi tekrar tipi yedi nükleotid birimi ACAAACT'nin ardışık tekrarlarından oluşur.

Farklı baz kompozisyonlarından dolayı birçok basit-dizi DNA'sı genomik DNA'nın geri kalanından CsCl yoğunluk gradienti içinde denge santrifügasyonu ile ayrıştırılabilir. DNA'nın yoğunluğu baz kompozisyonuna bağlıdır, AT-zengin diziler GC-zengin dizilerden daha az yoğundur (GC baz çiftinin moleküler ağırlığı AT baz çiftinden bir dalton daha büyüktür). Bu nedenle AT-zengin basit-dizi DNA'sı, *Drosophila* genomik DNA'sından CsCl gradientinde daha düşük yoğunlukta bir bant oluşturur (**Şekil 6.10**). Bu gibi tekrar-dizi DNA'ları DNA'nın ana bandından "uydu" gibi ayrıldıkları için, bunlar sıklıkla uydu DNA ya da **satellit DNA**'lar olarak adlandırılırlar. Bu diziler genom başına milyonlarca kez tekrar edilirler ve *Drosophila*'da genomik DNA'nın %40'ını, insanda ise %10'unu oluştururlar. Basit-dizi DNA'lar transkripsiyona uğramaz ve fonksiyonel genetik bilgi taşımazlar. Ancak bazıları, daha sonra bu bölümde tartışıldığı gibi, kromozom yapısında önemli roller oynar.

Diğer tekrarlayan DNA dizileri ardışık tekrarlar olarak bir arada bulunmak yerine genoma dağılmış halde bulunurlar. Bu serpiştirilmiş tekrar elemanları genom büyüklüğüne önemli katkıda bulunur ve insan genomik DNA'sının yaklaşık %45'ini oluştururlar (bkz. Tablo 6.3). Bu dizilerin en sık görülen iki sınıfı **kısa serpiştirilmiş elemanlar (short interspersed elements: SINE)** ve **uzun serpiştirilmiş elemanlardır (long interspersed elements: LINE)**. SINE'ler 100-300 baz çifti uzunluğundadır. Bu dizilerden yaklaşık 1.5 milyonu genoma dağılmış halde bulunur ve toplam insan DNA'sının yaklaşık %13'ünü oluşturur. İnsan LINE'lerinden köken alan çok sayıda tekrarlayan dizi ortalama yaklaşık 1 kb gibi kısa boyutlarda olmasına rağmen, çoğunluğu 4-6 kb uzunluğundadır. Genomda yaklaşık 850,000 LINE tekrar dizisi bulunur ve bu diziler insan genomunun yaklaşık %21'ini oluşturur.

Hem SINE'ler hem LINE'ler, **yer değiştirebilen elemanlara** (*transposable elements*) örnektir, yani genomik DNA'da farklı bölgelere hareket etme yetenekleri vardır. Hem SINE'ler hem LINE'ler **retrotranspozonlardır**, yani yer değiştirmeleri ters transkripsiyon aracılığıyla olur (**Şekil 6.11**). Bir SINE veya LINE'nin RNA kopyası hücre içinde revers transkriptaz tarafından DNA'ya çevrilir ve yeni DNA kopyası genomda yeni bir bölgeyle entegre olur. Dağınık tekrarlayan dizilerin üçüncü bir sınıfı, retrovirüslere benzer ve **retrovirüs-benzeri elemanlar** olarak adlandırılır. Bunlar da, genomda ters transkripsiyon ile hareket eder. İnsan retrovirüs benzeri elemanlar yaklaşık 2-10 kb uzunluğundadır. İnsan genomunda yaklaşık 450,000 retrovirüs benzeri eleman vardır ve insan DNA'sının yaklaşık %8'ini oluştururlar. Dağınık tekrarlayan elemanların dördüncü sınıfı **(DNA transpozonlar)** ters transkripsiyon ile hareket yerine, genom içinde kopyalanarak ve tekrar DNA'ya katılarak hareket ederler. İnsan genomunda yaklaşık 300,000 kopya DNA transpozonu vardır ve bunlar 80-3000 baz çifti uzunluğunda olup insan DNA'sının yaklaşık %3'ünü oluştururlar.

İnsan genomunun yaklaşık %42'sini oluşturan retrotranspozonlara dair bilgimiz retrovirüsler ile yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Bölüm 4'de tartışıldığı gibi, retrovirüsler (örneğin HIV) virüs partikülleri içinde



Şekil 6.11 Retrotranspozonların taşınması Kromozomal DNA'daki bir bölgede bulunan retrotranspozon RNA'ya transkribe olur, ve daha sonra ters transkripsiyon ile DNA' ya geri dönüştürülür. Retrotranspozon DNA' sı daha sonra yeni bir kromozomal bölgeye entegre olabilir.

RNA genomları barındırır, ancak enfekte ettikleri hücrelerde DNA provirüsü sentezi aracılığı ile genomlarını replike ederler (bkz. Şekil 4.13). Provirüs, viral enzim revers transkriptaz tarafından sentezlenir ve bir diğer viral enzim integraz tarafından enfekte hücrenin kromozomal DNA'sına entegre edilir. Viral yaşam döngüsü provirüsün transkripsiyonu ile devam eder. Böylece viral genomik RNA ile viral proteinlerin (revers transkriptaz ve integraz dahil olmak üzere) yapımını yönlendiren mRNA'lar üretilmiş olur. Daha sonra genomik RNA viral partiküllerin içerisine paketlenir ve bu partiküller hücreden salınır. Yeni oluşan virüsler bir başka hücreyi enfekte ederek, yeni bir provirüs DNA sentezi ve entegrasyonu döngüsünü başlatabilirler. Net etki, provirüsün bir RNA aracısının sentezi ve ters transkripsiyonu sayesinde bir kromozomal bölgeden diğerine hareketi şeklinde gözlenir.

Retrovirüs-benzeri elemanlar gibi bazı retrotranspozonlar yapı olarak retrovirüslere benzerler. Bunlar revers transkriptaz ile integraz enzimlerini kodlarlar ve retrovirüs replikasyonunda görülen mekanizmlara benzer mekanizmalar aracılığı ile aynı hücrede yeni kromozomal bölgelere taşınabilirler. Ancak, retrovirüs-benzeri elemanlar enfeksiyöz partiküllerin içerisine paketlenmemeleri ve bu yüzden bir hücreden diğerine yayılamamaları yönleri ile retrovirüslerden farklıdırlar. Transpozisyon mekanizmalarının ayrıntıları retrovirüs ve retrovirüs-benzeri elemanlardan farklı olsa da, LINE'ler de benzer biçimde revers transkriptaz ve hücresel DNA'ya entegrasyonlarını sağlayan bir enzim kodlarlar. Bunun aksine, uzunlukları sadece 100-300 baz çifti olan SINE'ler, revers transkriptaz ya da başka proteinler kodlamazlar. SINE'ler, tRNA ve protein taşınmasında rol oynayan küçük sitoplazmik RNA'lar gibi küçük RNA'ların ters transkripsiyonu sonucu ortaya çıkmışlardır. Revers transkriptaz ve DNA entegrasyonunda görev yapan enzimleri kodlamadıkları için, bunların transpozisyonunun genomun başka bölgelerince ve muhtemelen diğer retrotranspozonlar (örn.

Bilgi İçin

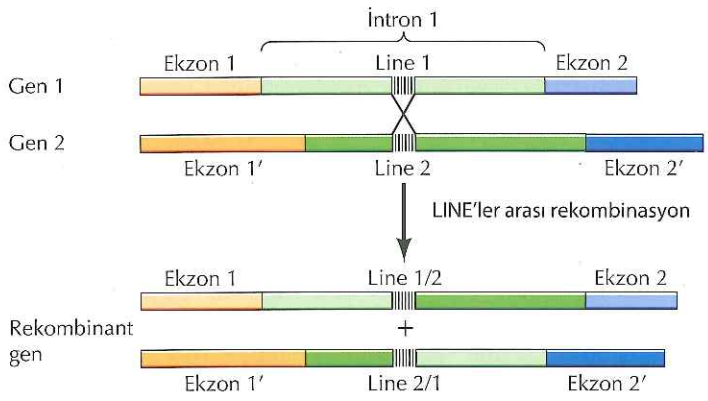
Kalıtsal hastalıklara yol açan genetik bozuklukların pek çoğu protein-kodlayan dizilerde değil, fonksiyonel kodlamayan bölgelerdeki mutasyonlardır.

LINE'ler) tarafından kodlanan revers transkriptaz ve integrazlar aracılığı ile gerçekleştiği düşünülmektedir.

Yüksek tekrarlı LINE'ler ve SINE'ler her ne kadar genomik DNA'nın önemli bir bölümünü oluşturuyorlarsa da, genomda rastgele bölgelere entegre olacak şekilde yer değiştirmeleri içinde bulundukları hücre için muhtemelen yararlı değildir. Bu transpozonlar yeni bir hedef bölgeye entegre olduklarında mutasyon indüklerler ve diğer mutasyon indükleyen ajanlarda olduğu gibi, transpozon katılımı ile oluşan mutasyonların çoğunun hücre için zararlı olması beklenir. LINE ve SINE'lerin yer değiştirmesi sonucu oluşan mutasyonlar hemofili, kistik fibrozis ve kas distrofisini de içeren birkaç kalıtsal insan hastalığı ve bazı kalıtsal kanserler ile ilişkilendirilmiştir. Son zamanlarda, insan kanserlerinde yapılan genom boyu çalışmalar kalıtsal olmayan çeşitli kanser tiplerinin gelişimi sürecinde LINE ve SINE'lerin yer değiştirmesinin sıklıkla oluştuğu bulunmuştur. Bu kanserlerde tespit edilen transpozisyonların kanser gelişiminde rol oynayan genleri etkilediğinin görülmesi, bu genlerin retrotranspozisyon yolu ile mutasyona uğramasının kanser gelişimine katkıda bulunmuş olabileceğine işaret etmektedir.

Diğer taraftan, yer değiştirebilen elemanların hareketleri ile oluşan bazı mutasyonlar, türlerin evrimine olumlu katkıda bulunarak yararlı olabilirler. Örneğin memeli genomlarındaki bazı retrotranspozonların, bitişik genlerin ekspresyonlarını kontrol eden düzenleyici dizileri içerdikleri bulunmuştur. Dahası, LINE'lere bitişik hücresel DNA dizileri transpozisyon sırasında sıklıkla birlikte taşınırlar. Bunun sonucunda LINE'lerin yer değiştirmesi, hücresel DNA dizilerinin yeni genomik bölgelere hareketine neden olur. LINE'ler aktif genlerin içerisine entegre olabilecekleri için, hücresel DNA dizilerinin birlikte taşınması, yeni kodlayıcı ve/veya düzenleyici dizi kombinasyonlarının oluşumuna yol açarak, yeni genlerin evrimine doğrudan katkıda bulunabilirler.

Transpozisyonlarının etkilerine ek olarak retrotranspozonlar, tekrarlayan diziler arasındaki rekombinasyonlar ile oluşan yeniden yapılanmaları stimule ederek genomun yeniden şekillenmesinde önemli rol oynamışlardır (**Şekil 6.12**). Örneğin, genomun farklı bölgelerine entegre olmuş LINE'ler arasındaki



Şekil 6.12 Tekrarlayan diziler arasında rekombinasyon Genomun farklı bölgelerindeki tekrarlayan dizilerin rekombinasyonu, genlerin yeniden düzenlenmelerine yol açabilir. Gösterilen örnekte, tekrarlayan diziler intronların içinde yer almaktadır, böylece, rekombinasyon iki farklı genin protein-kodlayan dizilerinin yeniden düzenlenmesi ile sonuçlanır.

rekombinasyon sonucu kromozomal DNA'nın yeniden düzenlenmesi, yeni genlerin ortaya çıkmasına yol açabilir. Yer değiştirebilen elemanlar, genetik çeşitliliğin ortaya çıkmasına katkıda bulunan gen yeniden düzenlenmelerini stimule etmede önemli rol oynamışlardır. Dolayısı ile, genomlarımızın şekillenmesinde de, anahtar roller oynamışlardır.

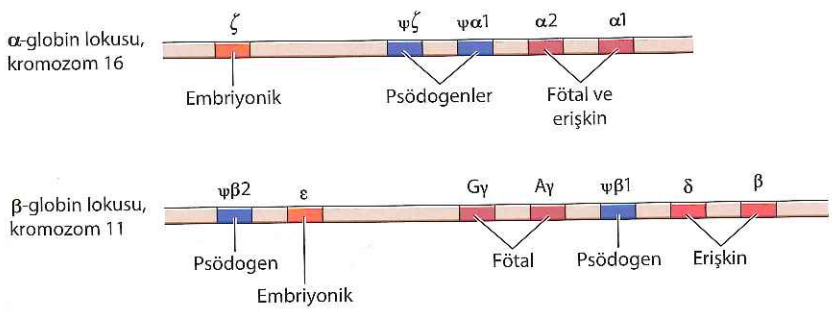
Ayrıca, yer değiştirebilen elemanların, lncRNA dizilerinin çoğunluğunun içinde bulunuyor olması da dikkate değerdir. Üstelik, bazı lncRNA'ların içindeki SINE dizilerinin bu lncRNA'ların gen düzenlenmesindeki rollerine doğrudan katkıda bulunuyor olduğu gösterilmiştir ki bu durum, lncRNA içindeki yer değiştiren elemanların gen düzenlenmesinde genel roller oynayabileceğini düşündürür.

Gen duplikasyonu ve psödogenler

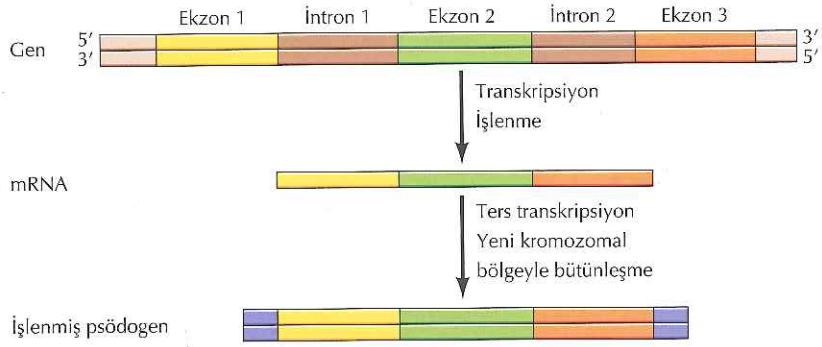
Ökaryotik genomların büyük boyutuna katkıda bulunan başka bir faktör ise, bazıları fonksiyonel olmayan çok sayıda genin çoklu-kopya halinde bulunmasıdır. Bazı durumlarda, büyük miktarlarda ihtiyaç duyulan RNA'ları veya proteinleri üretmek için, örneğin ribozomal RNA'lar veya histonla, genlerin çoklu kopyasına ihtiyaç duyulur. Başka durumlarda, ilişkili bir genler grubunun (bir **gen ailesinin**) farklı üyeleri farklı dokularda veya gelişimin farklı evrelerinde transkribe olabilir. Örneğin, hemoglobinin α ve β alt birimlerinin ikisi de insan genomunda gen aileleri tarafından kodlanır ve bu ailelerin farklı üyeleri embriyonik, fetal ve erişkin dokularda ifade edilir (**Şekil 6.13**). Bazı gen ailelerinin (örn., globin genleri) üyeleri, DNA'da bir bölgede toplanmıştır; diğer bazı gen ailelerinin üyeleri ise farklı kromozomlara dağılmıştır.

Gen ailelerinin, orjinal bir atasal genin duplikasyonu ile oluştuğu düşünülmektedir ve daha sonraki evrim sürecinde oluşan mutasyonlar ile farklı aile üyeleri birbirlerinden uzaklaşır. Böyle bir ayrılma, farklı dokularda veya gelişmenin farklı evrelerinde işlev görecek şekilde optimize olmuş ilişkili proteinlerin evrimine yol açabilir. Örneğin, fötal globinlerin oksijene afinitesi, erişkin globinlerinden daha yüksektir ve bu farklılık fetüsün maternal dolaşımdan oksijen almasını sağlar.

Ancak bekleneceği şekilde tüm mutasyonlar gen işlevini geliştirmez. Bunun yerine, bazı gen kopyalarında, işlevsel bir gen ürünü oluşturma yeteneğinin



Şekil 6.13 Globin gen aileleri İnsan α- ve β-globin gen aileleri, sırasıyla, 16. ve 11. kromozomlarda toplanmıştır. Her bir gen ailesi, spesifik olarak embriyonik, fötal ve erişkin dokularda eksprese olan genler ile bunlara ek olarak fonksiyonel olmayan gen kopyaları (psödogenler) içerir.



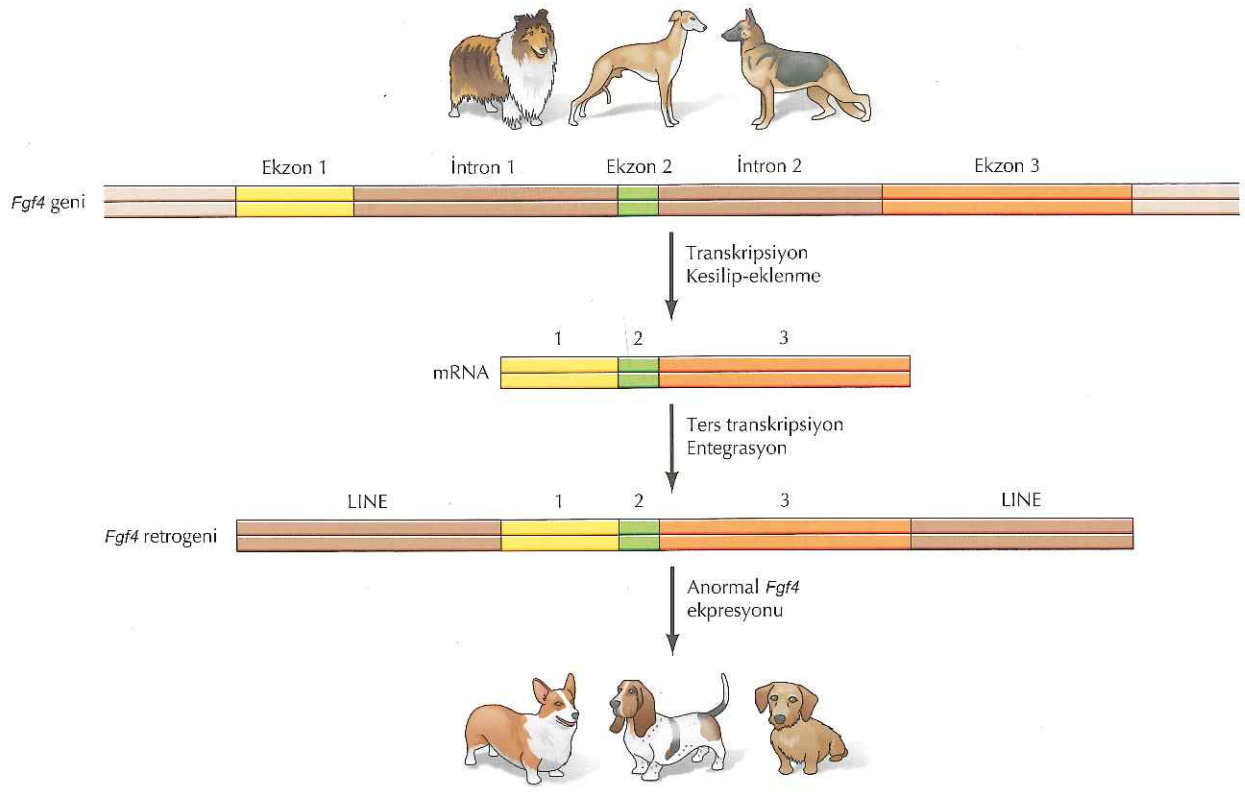
Şekil 6.14 İşlenmiş bir psödogenin oluşumu Bir genin transkripsiyonu ve kesilip-eklenmesi sonucunda intronların çıkarılmış olduğu bir mRNA ortaya çıkar. mRNA'nın ters transkripsiyonla kopyalanması ile intronları içermeyen bir cDNA oluşur. Kromozomal DNA'ya entegrasyonu sonucu işlenmiş bir psödogen ortaya çıkar.

kaybıyla sonuçlanan kalıcı mutasyonlar oluşur. Örneğin, insan α- ve β-globin gen ailelerinin her birinde mutasyonlarla inaktif olmuş birer gen bulunur. Bu tip işlevsel olmayan gen kopyaları (**psödogen** adı verilir), işlevsel bir genetik katkıda bulunmadan ökaryot genomların büyüklüğünü artıran evrimsel kalıntıları simgelerler. Yakın zaman önce yapılan çalışmalar insan genomunda 11,000 psödogen belirlemiştir.

Gen duplikasyonları iki farklı mekanizmayla oluşabilir. Birincisi, DNA'nın bir parçasının duplikasyonu ve bir DNA dizisi bloğunun genomda yeni bir yere transferi ile sonuçlanır. Bu tip DNA duplikasyonları 1 kb'den 50 kb'ye kadar dizileri kapsayabilir ve insan genomunun yaklaşık %5'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir. Tüm genomun duplikasyonu da gerçekleşebilir ve özellikle bitkilerde yaygındır. Örneğin *Arabidopsis* genom dizisi, tüm genomun en az iki kez duplike olduğu ve bunları takiben bazı duplike genlerin zamanla kaybolduğuna işaret etmektedir. *Arabidopsis*'deki protein-kodlayan gen sayısının yüksek olması (26,000) bu duplikasyonların bir sonucudur, tıpkı diğer bitki genomlarındaki büyük boyut ve yüksek gen sayısında olduğu gibi.

Alternatif olarak genler, mRNA'nın ters transkripsiyonu ve daha sonra cDNA kopyasının yeni bir kromozomal bölgeye entegrasyonu (**retrotranspozisyon**) ile duplike olabilir (Şekil 6.14). Bu tip gen duplikasyonu, RNA aracılarıyla hareket eden tekrarlayan elemanların yer değiştirmesine benzer biçimde, intron ve genin mRNA'ya transkripsiyonunu yönlendiren kromozomal dizileri içermeyen gen kopyalarının oluşmasına yol açar. Böylece, ters transkripsiyon ile bir genin duplikasyonu genellikle **işlenmiş psödogen** adı verilen inaktif bir gen kopyasının oluşmasına yol açar. İşlenmiş psödogenler, insan genomunda belirlenmiş olan psödogenlerin çoğunluğunu oluşturur.

İşlenmiş psödogenlerin aksine, ters transkripsiyon ile duplike olmuş genlerin bazıları yeni bir kromozomal bölgeye yerleştikten sonra da fonksiyonel kalırlar. İlginç bir örnek olarak, dachschund ve basset tazısı gibi bazı köpek ırklarında görülen kısa bacaklardan sorumlu olan gen verilebilir (Şekil 6.15). Bu durum, kemik büyümesini engelleyen bir genin retrotranspozisyonu sonucu ortaya çıkmıştır. Yer değiştirmiş olan retrogen aktif olmakla birlikte yeni yerindeki ifadesi düzensizdir ve bunun muhtemel nedeni de bitişiğindeki bir LINE



Şekil 6.15 Bir retrogenin transpozisyonu köpeklerde kısa bacakları belirler Köpek *Fgf4* geni uzun bacaklı köpek ırklarında normal kromozomal lokasyonundan eksprese olur. Kısa bacaklı köpeklerde, bu gen retrotranspozisyona uğramış ve bir LINE'nin ortasına entegre olmuştur. Bu yer değiştirmiş retrogen anormal olarak eksprese olur, böylece kemik büyümesi prematür olarak sonlanır ve bazı ırkların karakteristik özelliği olan kısa bacaklar ortaya çıkar.

tarafından düzenlenmesidir. Bu, LINE'lerin bitişik genlerin ekspresyonunu düzenlemelerinin bir örneğidir. Gen ifadesindeki bu bozulmanın sonucu olarak kemik büyümesi prematür olarak durur ve köpeklerde kısa bacak gelişir.

Kromozomlar ve Kromatin

Çoğu ökaryot genomunun, prokaryotlarınkinden çok daha karmaşık olmasının yanı sıra, ökaryot hücrelerin DNA'sı prokaryot hücrelerinkinden farklı organize olmuştur. Prokaryot genomları, genellikle çembersel DNA moleküleridir ve tek bir kromozomda bulunur. Aksine, ökaryotların genomları, her biri bir doğrusal DNA molekülü kapsayan, çok sayıda kromozomdan oluşur. Değişik türler arasında kromozomların sayı ve büyüklüğü çok farklı olsa da (**Tablo 6.4**), temel yapıları tüm ökaryotlarda aynıdır. Ökaryotik hücrelerin DNA'sı, bu DNA'yı hücre nükleusunda düzenli bir şekilde paketleyen küçük bazik proteinlere (histonlar) sıkıca bağlıdır. Ökaryotların çoğunun DNA miktarları göz

Animasyon 6.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a6.1
Kromatin ve Kromozomlar
Ökaryotik bir hücrede DNA sıkı biçimde histon proteinlerine bağlıdır (kromatin oluşturur), ve hücre bölünme için hazırlandığında kromatin kendi üzerine defalarca katlanarak kompakt kromozomları oluşturur.

Tablo 6.4 Ökaryotik Hücrelerin Kromozom Sayıları

Organizma	Genom büyüklüğü (Mb)[a]	Kromozom sayısı[a]
Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)	12	16
Cıvık mantar (*Dictyostelium*)	70	7
Arabidopsis thaliana	125	5
Mısır	2200	10
Soğan	15,000	8
Zambak	50,000	12
Nematod (*Caenorhabditis elegans*)	97	6
Sirke sineği (*Drosophila*)	180	4
Kurbağa (*Xenopus laevis*)	3000	18
Akciğerli balık	50,000	17
Tavuk	1200	39
Fare	3000	20
İnek	3000	30
Köpek	3000	39
İnsan	3000	23

[a]Genom büyüklüğü ve kromozom sayısı haploid hücreler için verilmiştir. Mb = milyon baz çifti.

önünde bulundurulunca, bu görevin ne kadar zor olduğu anlaşılabilir. Örneğin, insan DNA'sı uzunluğunun tam olarak açılmış halde 2 metredir, ancak bu DNA çapı 5 ile 10 μm arasında olan bir çekirdeğe sığmak zorundadır.

Kromatin

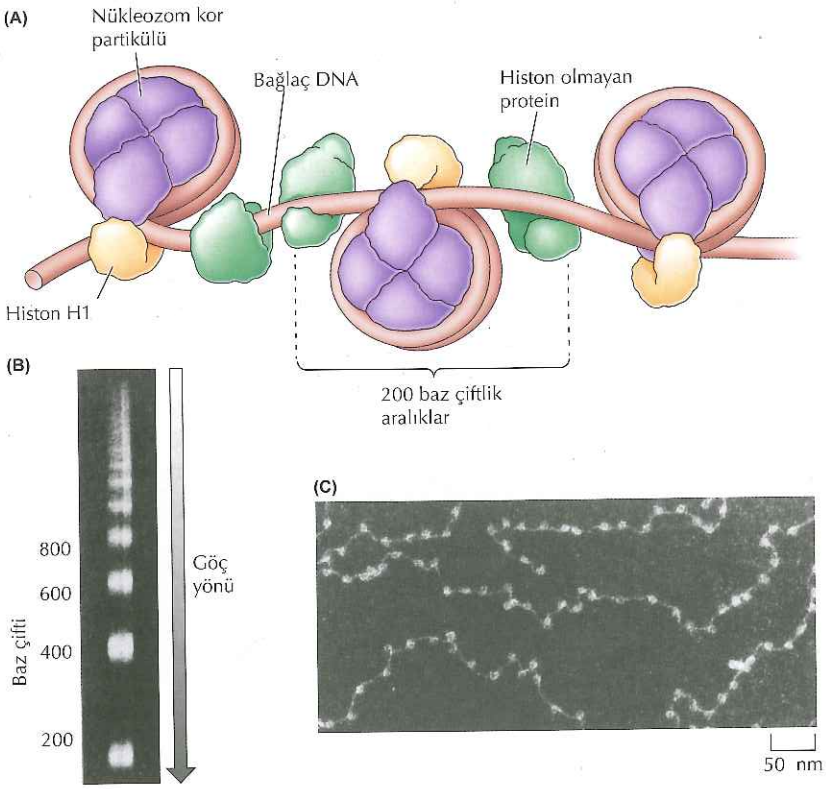
Ökaryotik DNA ve proteinlerden oluşan komplekslere **kromatin** adı verilir ve genel olarak, DNA'nın yaklaşık iki katı protein içerirler. Kromatinin temel proteinleri, negatif yüklü DNA molekülüne bağlanmayı kolaylaştıran bazik amino asitleri (arjinin ve lizin) yüksek oranda bulunduran küçük proteinler olan **histonlar**'dır. Beş temel tip histon vardır (H1, H2A, H2B, H3 ve H4) ve farklı ökaryot türleri arasında çok benzerdirler (**Tablo 6.5**). Histonlar ökaryot hücrelerde çok bol miktarda bulunan proteinlerdir ve oluşturdukları kütle,

Tablo 6.5 Başlıca Histon Proteinleri

Histon	Moleküler ağırlık	Amino asitlerin sayısı	Lizin ve arginin yüzdesi
H1	22,500	244	30.8
H2A	13,960	129	20.2
H2B	13,774	125	22.4
H3	15,273	135	22.9
H4	11,236	102	24.5

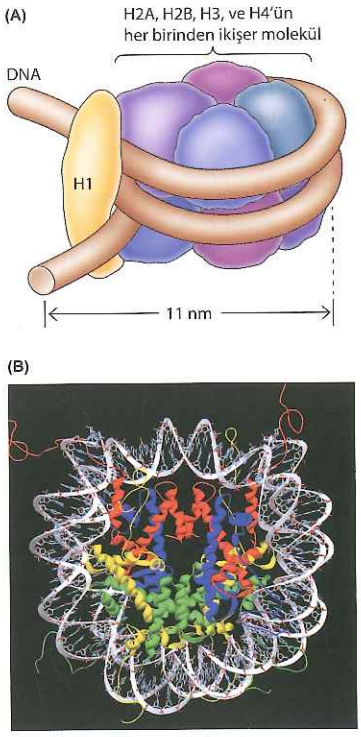
hücrenin DNA'sına yaklaşık olarak eşittir. Kromatin ayrıca, hemen hemen eşit kütle oluşturacak şekilde, çok çeşitli histon dışı kromozomal proteinler kapsar. Bu proteinlerin binden fazla farklı tipi vardır ve DNA replikasyonu ve gen ifadesi dahil çeşitli aktivitelerde rol oynarlar.

Kromatinin temel yapısal birimi olan **nükleozom**, ilk kez Roger Kornberg tarafından 1974'de tanımlanmıştır (Şekil 6.16). İki tip deney, Kornberg'in nükleozom modelini önermesine yol açmıştır. İlk olarak, kromatinin mikrokokkal nükleaz (DNA'yı parçalayan bir enzim) ile kısmi sindiriminin, yaklaşık 200 baz çifti uzunluğunda DNA fragmanları oluşturduğu saptanmıştır. Bunun aksine, çıplak DNA'nın, (proteinlerle bağlantılı olmayan) benzer şekilde sindirimi, rastgele büyüklükteki fragmanların oluşturduğu yayma görüntüsüne yol açmıştır. Bu sonuçlar, kromatinde, DNA'ya protein bağlanmasının DNA bölgelerini nükleaz sindiriminden koruduğu ve böylece, enzimin DNA'ya sadece yaklaşık 200 baz çifti ile ayrılmış bölgelerden saldırabildiğini düşündürmüştür.



Şekil 6.16 Nükleozomlarda kromatinin organizasyonu (A) Nükleozom kor partikülünde DNA histonlara sarılı halde bulunur ve histon H1 tarafından sabitlenir. Histon-dışı proteinler nükleozom kor partikülleri arasındaki bağlayıcı DNA'ya bağlanır. (B) Kromatinin mikrokokkal nükleaz ile sınırlı sindirimi sonucu elde edilen DNA fragmanlarının jel elektroforezi. Nükleozom kor partikülleri arasındaki bağlayıcı DNA özellikle hassastır, böylece kromatinin sınırlı sindirimi 200 baz çiftinin katları uzunluğunda fragmanlar ortaya çıkarır. (C) Açılmış bir kromatin iplikçiğinin elektron mikrografı, boncuklu yapısını yansıtıyor. (B, Roger Kornberg'in izni ile, Stanford Üniversitesi; C, Ada L. Olins ve Donald E. Olins'in izni ile, Oak Ridge Ulusal Laboratuvarı.)

Video 6.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v6.1
DNA Nasıl Paketlenir DNA proteinler çevresinde sıkı biçimde sarılarak kromatini oluşturur, kromatin ise daha da fazla katlanarak ve paketlenerek kromozomu oluşturur.

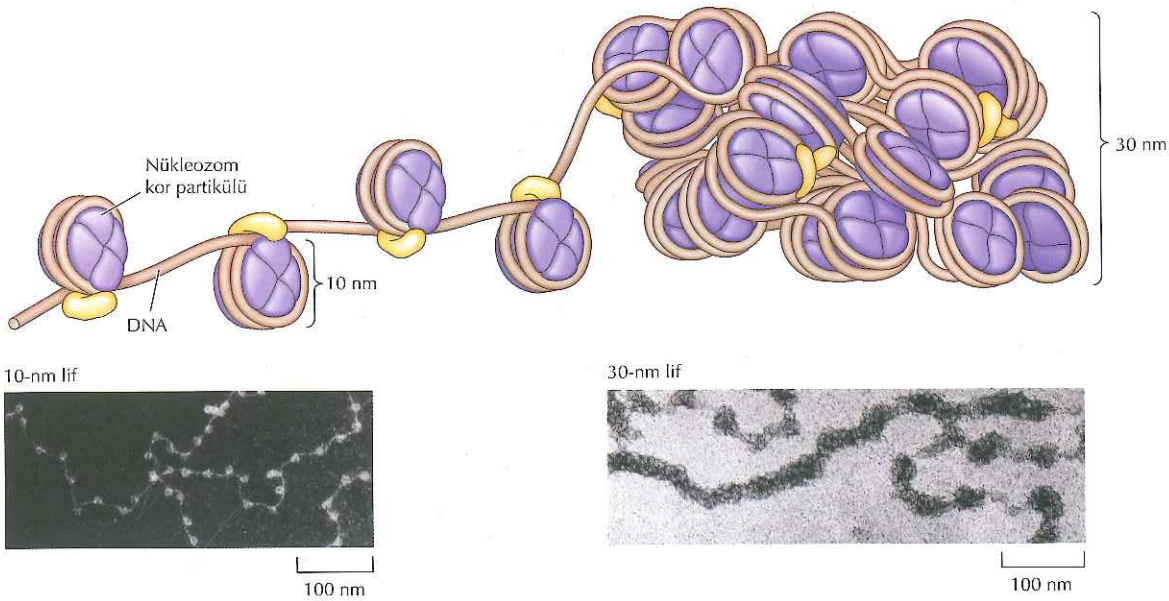


Şekil 6.17 Bir kromatozomun yapısı (A) Bir nükleozom kor partikülü, histon çekirdek çevresine sarılmış 147 baz çiftlik DNA' dan oluşur. Histon çekirdek ise H2A, H2B, H3, ve H4 histonlardan her birinin ikişer molekülünün bir araya gelmesi ile oluşur. Bir kromatozom iki tam dönüşlü DNA ve onu sabitleyen bir H1 molekülü içerir. (B) Nükleozom çekirdek parçacık modeli. DNA omurgası beyaz renk ile gösterilmiştir. Histonlar kırmızı (H3), mavi (H4), sarı (H2A), ve yeşil (H2B) ile gösterilmiştir. (B, C. A. Davey et al., 2002. *J. Mol. Biol.* 319: 1097.)

Bu düşünceyle uyumlu olarak, elektron mikroskopisi kromatin liflerinin boncuk şekilde bir görünümü olduğunu ve boncukların yaklaşık 200 baz çiftilik aralıklarla yerleştiğini ortaya çıkarmıştır. Böylece hem nükleaz sindirimi hem elektron mikroskobik çalışmalar, kromatinin 200 baz çiftlik tekrarlanan birimlerden oluştuğunu kanıtlamış ve bunlara nükleozomlar adı verilmiştir.

Kromatinin mikrokokkal nükleaz ile daha ileri sindirimi elektron mikroskopide görülebilen boncuklara karşılık gelen partikülleri (**nükleozom kor partikülleri** adı verilir) ortaya çıkarır. Bu partiküllerin detaylı bir şekilde analizi, ikişer H2A, H2B, H3 ve H4'ten (kor histonlar) oluşan bir histon çekirdek bölgesi etrafında 1.67 kez sarılmış, 147 DNA baz çifti kapsadıklarını göstermiştir (Şekil 6.17). Beşinci histon yani H1 molekülü, nükleozom kor partikülüne her girişinde, DNA'ya bağlanır. Bu, **kromatozom** adı verilen bir kromatin alt birimi oluşturur ve bu da histon çekirdek bölgesi etrafına sarılmış ve H1 tarafından (bağlayıcı histon) sabitlenmiş, 166 baz çifti DNA'dan oluşur.

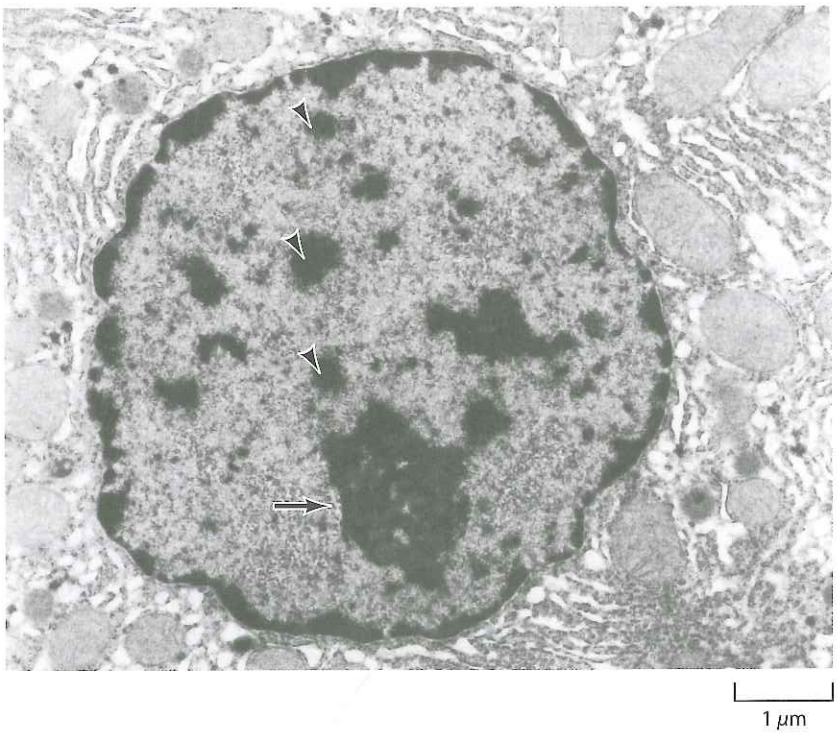
DNA'nın histonlarla paketlenmesi, ortalama 50 baz çifti uzunluğunda olan bağlaç DNA parçalarıyla ayrılan kromatozomlardan oluşan, yaklaşık 10 nm çaplı bir kromatin lifi oluşturur (Şekil 6.18). Elektron mikroskobunda bu



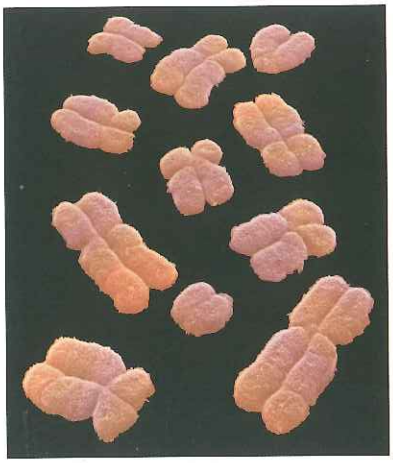
Şekil 6.18 Kromatin lifleri DNA'nın nükleozomlara paketlenmesi, yaklaşık 10 nm çapında bir lif oluşturur. Kromatin daha da katlanarak dönüş başına yaklaşık altı nükleozom içeren 30-nm çapında bir ipliğe yoğunlaşır. (Fotoğraflar Ada L. Olins ve Donald E. Olins'in izni ile, Oak Ridge Ulusal Laboratuvarı.)

10 nm'lik lifin, nükleozom modelini düşündüren, boncuklu bir görünümü vardır. DNA'nın böyle bir 10-nm kromatin lifi haline paketlenmesi, boyunu yaklaşık altı kez kısaltır. Kromatin sarmallar oluşturarak daha da fazla katlanabilir ve 30-nm'lik liflere yoğunlaşabilir, böylece toplam yoğunlaşma yaklaşık 50 katı bulabilir. Bu kromatin yoğunlaşması evresinde histon H1 molekülleri arasındaki etkileşimlerin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu, kromozomal DNA'nın DNA replikasyonu ve transkripsiyon gibi işlemler için erişilebilirliğini etkilediği için kritik öneme sahiptir. 30-nm liflerin kendi üzerlerine katlanması kromatinin hücre içerisinde daha da fazla yoğunlaşmasına yol açabilir. Kromatin yoğunlaşmasının önemine rağmen, 30-nm ve daha yoğun liflerin yapıları henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Kromatin yoğunlaşmasının düzeyi, hücrenin yaşam döngüsü sürecinde değişim gösterir ve Bölüm 8'de tartışıldığı gibi, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. İnterfazdaki (bölünmeyen) hücrelerde kromatinin çoğu (**ökromatin** adı verilir) nispeten yoğun olmayan durumdadır ve çekirdek içerisinde dağılmıştır (**Şekil 6.19**). Hücre döngüsünün bu aşamasında, gen transkripsiyonu gerçekleşir ve DNA hücre bölünmesine hazırlanacak şekilde replike olur. İnterfaz nükleuslarındaki kromatinin çoğu, 30-nm'lik lifler, ya da biraz daha yoğunlaşmış halde 60-130-nm lifler halinde bulunur. Aktif olarak transkripsiyonu yapılan genler, DNA'yı transkripsiyon mekanizmalarına daha açık hale getiren daha da az yoğunlaşmış bir durumdadır. Ökromatinin aksine, interfaz kromatininin yaklaşık %10'u (**heterokromatin** adı verilir), mitoza giren hücrelerin kromatinine benzeyen, çok yoğunlaşmış bir durumdadır.



Şekil 6.19 İnterfaz kromatin Bir interfaz çekirdeğinin elektron mikrografı. Ökromatin çekirdek içinde dağılmıştır. Heterokromatin ok başları ile, çekirdekçik ise bir ok ile belirtilmiştir. (Ada L. Olins ve Donald E. Olins'in izni ile, Oak Ridge Ulusal Laboratuvarı.)

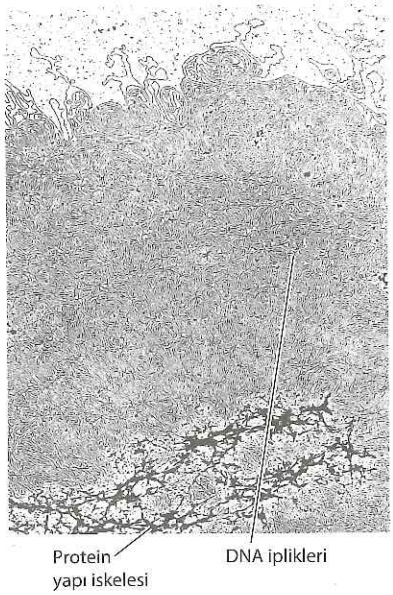


Şekil 6.20 Mitoz sırasında kromatin yoğunlaşması Metafaz kromozomlarının tarayıcı elektron mikrografisi. Yapay olarak renklendirilmiştir.

Heterokromatin transkripsiyonel olarak inaktiftir ve sentromerlerde ve telomerlerde bulunanlara benzeyen tekrarlayan DNA dizileri ile (bir sonraki bölümde anlatılacak) incelenen hücre tipinde ifade edilmeyen genleri içerir (örn. inaktif X kromozomları; bkz. Şekil 6.9).

Hücreler mitoza girerken kromozomları son derece yoğun bir hal alır ve böylece yavru hücrelere dağıtılabilirler. İnterfaz nükleusundaki kromatin, ilmekler şeklinde organize olmuştur ve bu ilmeklerin kendi üstlerine katlanarak mitotik hücrelerdeki 10,000 kat daha yoğun metafaz kromozomlarını oluşturdukları düşünülmektedir (**Şekil 6.20**). Bu kadar yoğun kromatin RNA sentezinde kullanılamıyacağı için mitoz sırasında transkripsiyon durur. Elektron mikrografilerine göre metafaz kromozomlarındaki DNA, bir protein iskeleye tutunan büyük ilmekler şeklinde organize olmuştur (**Şekil 6.21**). Ancak şu anda, ne bu yüksek yoğunluktaki kromatinin detaylı yapısını, ne de kromatin yoğunlaşmasının mekanizmasını anlayabilmiş değiliz.

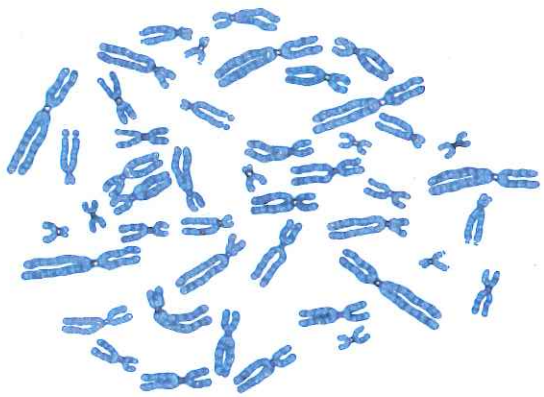
Metafaz kromozomları o kadar yüksek derecede yoğunlaşmışlardır ki, morfolojileri ışık mikroskobu ile incelenebilir (**Şekil 6.22**). Çeşitli boyama teknikleri, boyaların ya da floresan moleküllerin AT-zengin DNA dizileri ile GC-zengin DNA dizilerine farklı afiniteler ile bağlanmaları sonucu ortaya çıkan ve birbirini izleyen açık ve koyu kromozom bantlarından oluşan klasik boyama paternleri ortaya çıkarırlar. Bu bantlar her bir kromozoma özgüdür ve ayrı kromozom bölgelerine karşılık geliyor gibi görünmektedirler. *In situ* hibridizasyon yolu ile genlerin özgül kromozom bantlarına lokalize edilebilmeleri, metafaz kromozomlarındaki paketlenmenin son derece kontrollü ve tekrarlanabilir bir işlem olduğuna işaret etmektedir.



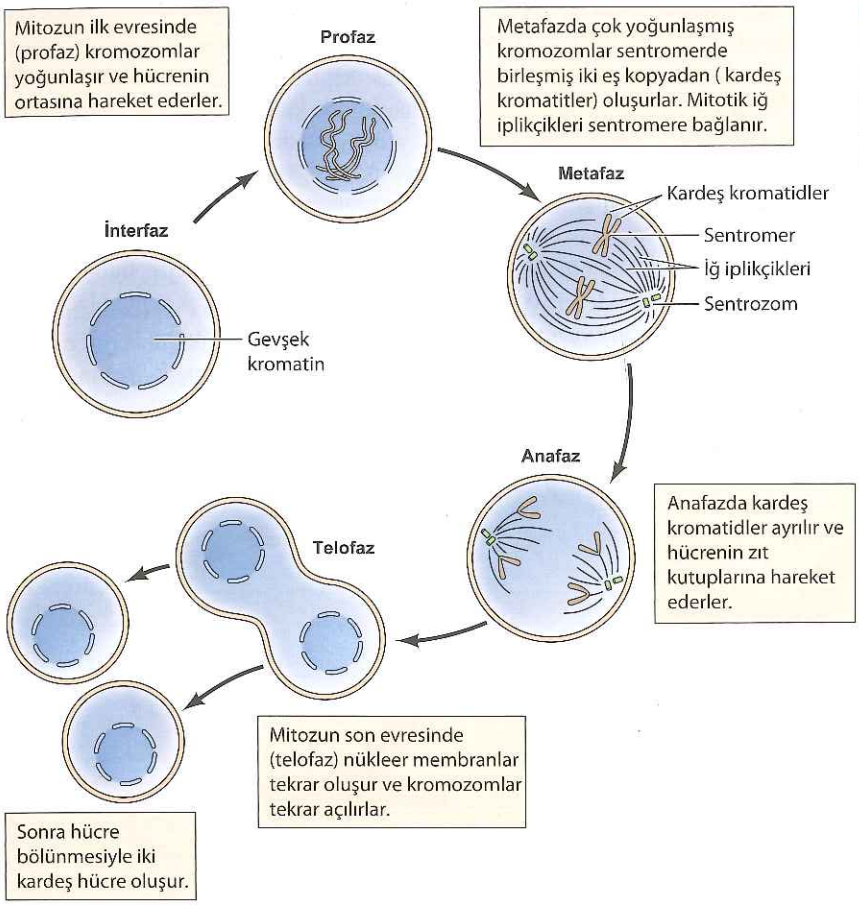
Şekil 6.21 Metafaz kromozomlarının yapısı Histonlardan arındırılmış metafaz kromozomlarının protein iskelesine tutunan DNA ilmeklerinin elektron mikrografisi (J. R. Paulson ve U. K. Laemmli, 1977. *Cell* 12:817'den alınmıştır).

Sentromerler

Sentromer, eşlenmiş kromozomların mitoz sırasında yavru hücrelere doğru biçimde dağıtılmasında kritik rol oynayan özelleşmiş bir kromozom bölgesidir (**Şekil 6.23**). Hücre DNA'sı interfaz sırasında eşlenir ve böylece mitoz başlangıcından önce her bir kromozom iki kopya halinde bulunur.



Şekil 6.22 İnsan metafaz kromozomları Bir metafaz hücresinden hazırlanmış insan kromozomlarının bir mikrografisi.

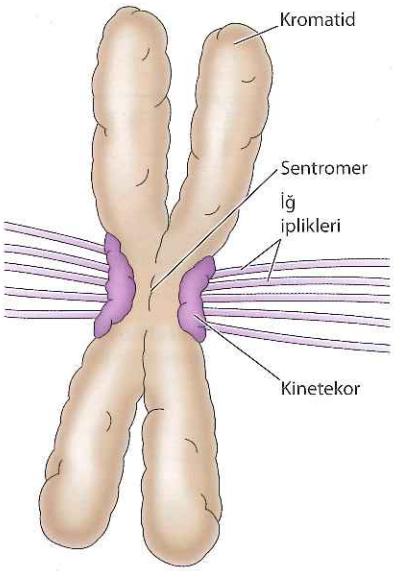


Şekil 6.23 Mitoz sırasında kromozomlar DNA interfazda replike olduğu için, hücre mitoza girmeden önce, her kromozomun birbirinin aynısı iki kopyasına sahiptir.

Hücreler mitoza girerken kromatin yoğunlaşması, birbirinin tıpatıp aynısı iki kardeş kromatidden oluşan metafaz kromozomlarının oluşumuna yol açar. Bu kardeş kromatidler sentromerde bir arada tutulur ve burası daralmış bir kromozomal bölge olarak görülür. Mitoz ilerledikçe mitotik iğin mikrotübülleri sentromere tutunur ve iki kardeş kromatid ayrılıp iğin karşıt kutuplarına hareket ederler. Mitozun sonunda nükleer zarlar tekrar oluşur, kromozomlar gevşer ve böylece her ebeveyn kromozomundan birer kopya içeren kardeş nükleuslar oluşur.

Sentromerler böylece, hem kardeş kromatidlerin birbiriyle ilişkiye girdiği yerler, hem de mitotik iğin mikrotübüllerinin bağlanma yeri olarak görev yaparlar. Sentromerlerle ilişkili proteinler **kinetokor** adı verilen özelleşmiş yapılar oluştururlar (Şekil 6.24). Mikrotübüllerin kinetokor proteinlerine bağlanması, kromozomların mitotik iğe bağlanmasına aracı olur.

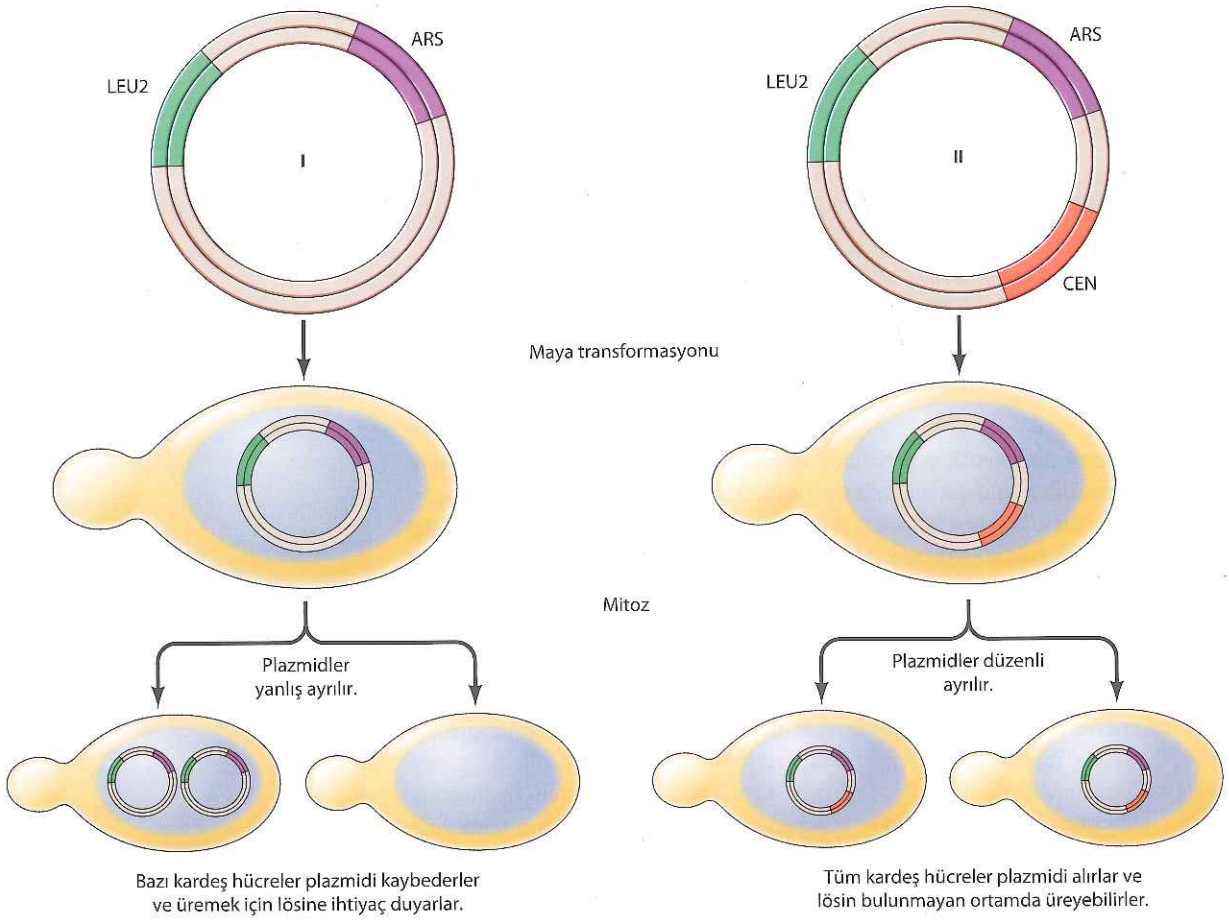
Kinetokorla ilişkili proteinler daha sonra, kromozomların iğ iplikçikleri boyunca hareketlerini ve kromozomların kardeş nükleuslara ayrılmasını sağlayan "moleküler motorlar" olarak görev yaparlar.



Şekil 6.24 Bir metafaz kromozomunun sentromeri Sentromer, iki kardeş kromatidin metafazda birleştiği bölgededir. Özel proteinler sentromerik DNA'ya bağlanır ve iğ ipliklerinden oluşmuş bölüme, kinetekora dönüşür.

Sentromerik DNA dizileri ilk olarak, fonksiyonlarının mitoz sırasında plazmidlerin ayrımının takibi ile test edilebildiği organizmalar olan mayalarda tanımlanmışlardır (**Şekil 6.25**). İşlevsel sentromerlere sahip plazmidler, kromozomlar gibi ayrılırlar ve mitozdan sonra kardeş hücrelere eşit şekilde dağılırlar. Ancak, işlevsel bir sentromer yoksa, plazmid uygun şekilde ayrılmaz ve birçok kardeş hücre plazmid DNA'yı alamaz. Bu tip çalışmalar sentromer işlevi için gerekli dizilerin tanımlanmasını sağlamıştır. Bu tip deneyler, önce iyi çalışılmış bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'nın sentromer dizilerinin, üç dizi elemanından oluşan yaklaşık 125 baz çiftlik bölgede bulunduğunu göstermiştir: Birbirinden 78-86 baz çifti uzaklıkta, A/T'den çok zengin DNA'dan oluşan 8 ve 25 baz çifti uzunluğunda iki kısa dizi (**Şekil 6.26A**).

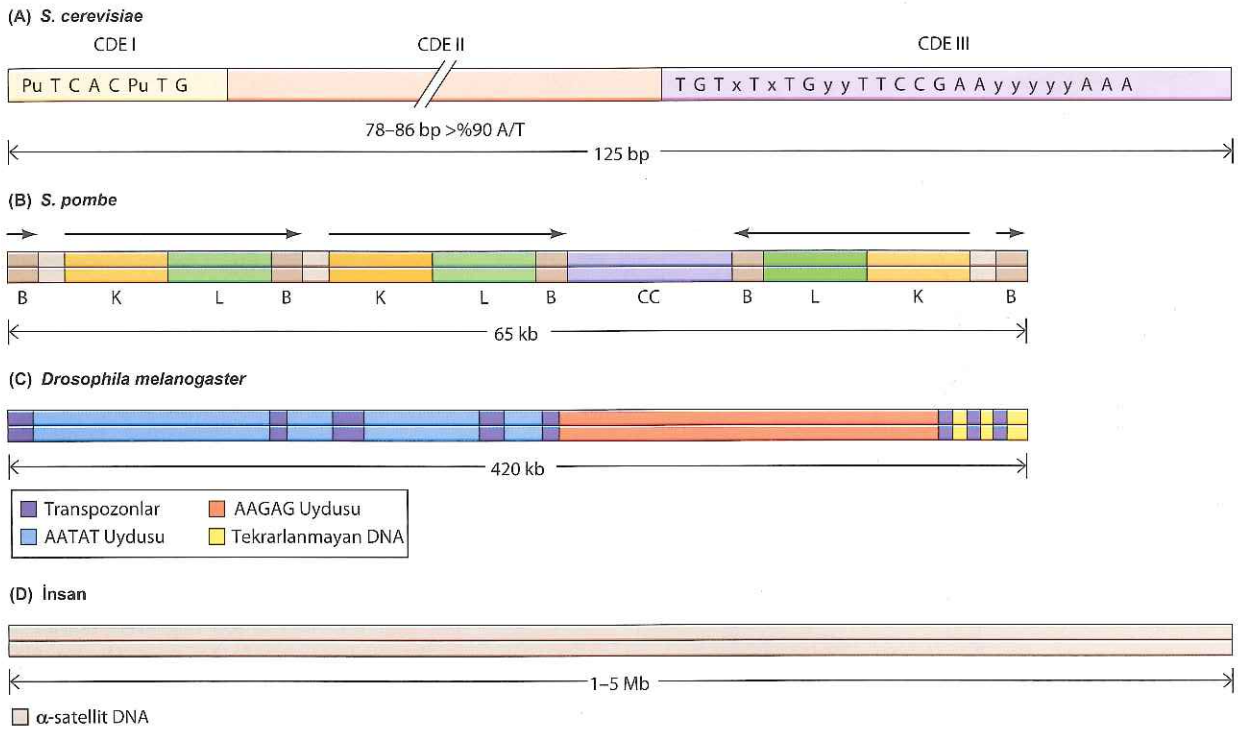
Ancak *S. Cerevisiae*'da tanımlanmış kısa sentromer dizileri, fisyon mayası *Schizosaccharomyces pombe* de dahil olmak üzere, diğer ökaryotlardaki durumu yansıtmıyor gibidir. *S. cerevisiae* ve *S. pombe*'nin ikisi de maya olmakla beraber, birbirlerinden, her birinin insandan farklı olduğu kadar, farklı görünmektedirler



Şekil 6.25 Mayada bir sentromerin test edilmesi Gösterilen her iki plazmid de seçilebilir bir belirteç (LEU2) ve mayada replikasyon orijini olarak (ARS ya da otonom olarak replike olan dizi) görev yapan DNA dizileri içerir. Ancak, plazmid I'in sentromeri yoktur ve bu yüzden mitozda hatalı dağılıma bağlı olarak sıklıkla kaybolur. Aksine, plazmid II'de bulunan sentromer (CEN), plazmidin yavru hücrelere hatasız biçimde ve olması gerektiği gibi aktarılmasını sağlar.

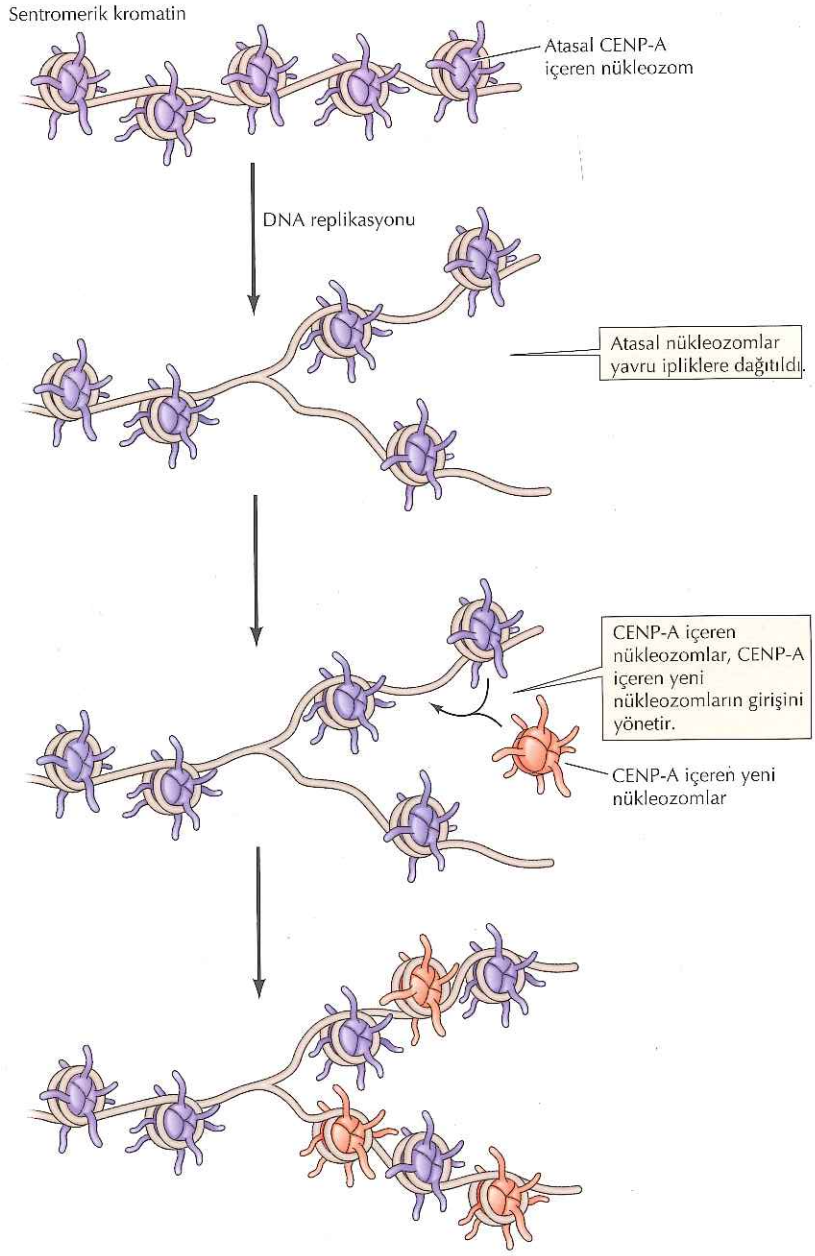
ve hücre biyolojileriyle çok farklıdırlar. Bu iki maya türü böylece, basit ve kolayca çalışılan, ökaryot hücreler için birbirlerini tamamlayan modeller oluştururlar. *S. pombe*'nin sentromerleri, DNA'da 40-100 kb'lik bir yer kaplar ve *S. cerevisiae*'ninkilerden yaklaşık 1,000 kez büyüktür. Etrafında tekrarlayan diziler bulunan, 4-7 kb'lik tek-kopya DNA'dan ibarettir (**Şekil 6.26B**). Hem merkez bölgesi hem de çevredeki tekrarlayan diziler sentromer işlevi için gereklidir ve bu nedenle *S. pombe*'nin sentromerleri *S. cerevisiae*'ninkilerden çok daha karmaşık gibi görünmektedir.

Drosophila kromozomu üzerine yapılan çalışmalar, yüksek ökaryotlardaki bir sentromeri ilk kez karakterize etmiştir (**Şekil 6.26C**). *Drosophila* sentromeri, 420 kb büyüklüğündedir ve çoğu (%85'ten fazlası) AATAT ve AAGAG dizileri şeklinde, çok tekrarlayan iki uydu DNA'dan oluşur. Sentromerin geri kalan kısmı, *Drosophila* genomunda başka bölgelerde de bulunan, dağınık, yer değiştirebilen elemanlardan ve A/T'den zengin DNA'dan oluşan bir tekrarlamayan bölgeden oluşur.



Şekil 6.26 Sentromerik DNA Dizileri (A) *S. cerevisiae* sentromer (CEN) dizileri iki kısa korunmuş diziden (CDE I ve CDE III) ve bunları ayıran 78-86 baz çiftlik (bp) A/T-zengin DNA' dan (CDE II) oluşur. Gösterilen diziler konsensüs dizileri olup her bir maya kromozomunun sentromer dizilerinin analizi sonucu ortaya çıkarılmıştır. Pu = A ya da G; x = A ya da T; y =her hangi bir baz. (B) *S. pombe* chromosome II sentromerindeki dizilerin düzeni şekilde gösterilmiştir. Sentromer, üç tane tekrarlayan dizi elamanının (B, K ve L) ardışık tekrarları ile çevrelenen özgün DNA dizilerinin oluşturduğu merkezi çekirdekten (CC) oluşmaktadır. (C) Bir *Drosophila* sentromeri iki satellit diziden, yer değiştirebilen elemanlardan ve tekrarlanmayan DNA' dan oluşur ve yüzlerce kilobaz (kb) uzunluğundadır. (D) İnsan sentromerleri 171 baz çiftlik A/T-zengin ardışık tekrarlayan satellit DNA' dan oluşur ve 1-5 milyon baz çifti (Mb) uzunluğundadır.

Diğer bitki ve hayvanların sentromerleri, yüksek tekrarlı dizilerin geniş yer kapladığı heterokromatin ile karakterizedir. *Arabidopsis*'de sentromerler toplam 3 milyon baz çifti uzunluğunda ve 178 baz çiftilik A/T-zengin satellit DNA'dan oluşur. İnsanlar ve diğer primatlarda, primer sentromerik dizi bir α-satellit DNA'dır ve 1-5 milyon baz çiftine yayılmış bu satellit DNA 171 baz çiftlik A/T-zengin dizilerin ardışık tekrarlarından oluşur (Şekil 6.26D).



Şekil 6.27 CENP-A'nın epigenetik kalıtımı Sentromerlerdeki nükleozomlar H3-benzeri histon varyantı olan CENP-A içerirler. DNA replike olduğunda, atadan gelen CENP-A-barındıran nükleozomlar her iki yavru ipliğe de dağılır. Bu CENP-A-barındıran nükleozomlar yeni CENP-A-barındıran nükleozomların katılımını yönetirler, böylece sentromerlerin kromatin yapısı korunmuş olur.

Kapsamlı uğraşlara rağmen, *S. cerevisiae* dışındaki ökaryotlarda sentromer işlevi gören DNA dizilerini saptamak mümkün olmamıştır. Diğer taraftan, sentromerlerdeki kromatinin kendine has bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle, sentromerik kromatinde histon H3'ün yerini, H3-benzeri bir histon varyantı olan **CENP-A** almaktadır. CENP-A, bugüne kadar çalışılmış tüm organizmaların sentromerlerinde istisnasız yer almaktadır ve sentromer işlevi için gerekli diğer kinetekor proteinlerinin bir araya gelmesi için CENP-A barındıran nükleozomlar gereklidir. Öyle görünmektedir ki, spesifik bir DNA dizisi değil de kromatin yapısı sentromer kimlik ve işlevinin birincil belirleyicisidir.

Önemli olarak, kendine has bir kromatin yapısının bulunması, sentromerlerin hücre bölünmesi sırasında spesifik DNA dizileri olmadığında bile stabil olarak devamlılıklarını sağlar. Bu, **epigenetik kalıtımın**—bilginin atadan yavruya DNA dizisinden bağımsız olarak kalıtılmasına bir örnektir. Bu ve diğer pek çok epigenetik kalıtım tiplerinde (Bölüm 8'de tartışılacak) bilgi histonlar tarafından taşınır (Şekil 6.27). Kromozomal DNA replike olduğunda, atadan gelen nükleozomlar iki yavru ipliğe dağıtılır, böylece CENP-A her iki yeni replike kromozomun sentromerinde yer alır. Bu CENP-A-barındıran nükleozomların, CENP-A-barındıran yeni nükleozomların bir araya gelmesini yönettiği, böylece hücre bölünmesinin ardından kromatin yapısının korunduğu gösterilmiştir.

Telomerler

Ökoryatik kromozomların sonlarındaki **telomer** adı verilen diziler, kromozomun replikasyonunda ve devamlılığının sağlanmasında çok önemli roller oynar. Telomerler, önceleri, kırık kromozomların ökoryatik hücrelerde kalıcı olmamaları nedeniyle kromozom uçlarında özel dizilere gerek olduğunun düşünülmesiyle farkedilmiştir. Bu durum, daha sonra, *Tetrahymena* protozoa telomerlerinin, doğrusal maya plazmid DNA molekülünün uçlarına eklendiği deneylerle gösterilmiştir. Telomerik DNA dizilerinin eklenmesi, bu plazmidlerin mayalarda doğrusal kromozom benzeri moleküller olarak replike olmasını sağlamıştır ve bu da doğrusal DNA moleküllerinin replikasyonu için, telomerlerin gerekli olduğunu direkt olarak göstermiştir.

Birçok ökaryotun telomer DNA dizileri benzerdir ve bir iplikte G baz kalıntısı kümelerini kapsayan, basit dizili DNA tekrarlarından oluşur (Tablo 6.6). Örneğin, insanlarda ve diğer memelilerde telomer tekrarlarının dizisi AGGGTT'dir ve *Tetrahymena*'daki telomer tekrarı GGGGTT'dir. Bu diziler, yüzlerce veya binlerce kez tekrarlanır ve 3′ tek iplikli DNA uzantısı olarak sonlanır. Bazı organizmaların (insan dahil) tekrarlanan telomer dizileri, kromozom uçlarında ilmek oluşturur ve kromozom uçlarını bozulmadan koruyan bir protein kompleksine (shelterin) bağlanır (Şekil 6.28).

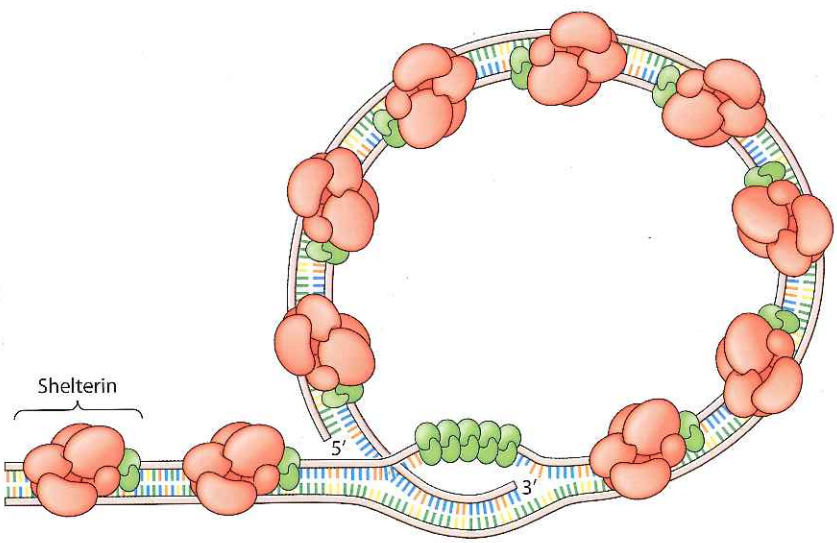
Telomerler doğrusal DNA moleküllerinin uçlarının replikasyonunda kritik rol oynarlar (bkz. Bölüm 7). DNA polimeraz, büyüyen bir DNA zincirini uzatabilir ancak doğrusal bir DNA molekülünün ucunda yeni bir zincirin sentezini başlatamaz. Bunun sonucunda, doğrusal kromozomların uçları DNA polimerazın normal aktivitesi yolu ile replike olamaz. Bu problem, telomerik DNA dizilerini replike etmek için revers transkriptaz aktivitesini kullanan özel bir enzimin, **telomeraz**, evrimi ile çözülmüştür. Telomerlerin korunması, hücrelerin yaşam süresi ve üreme kapasitelerini belirleyen önemli bir faktör gibi görünmektedir, bu yüzden telomerlere ve telomeraza dair araştırmalar, yaşlanma ve kanser gibi durumlara yeni bakış açıları getirme umudu taşımaktadır.

Tablo 6.6 Telomerik DNA'lar

Organizma	Telomerik tekrar dizisi
Mayalar	
Saccharomyces cerevisiae	TG_{1-3}
Schizosaccharomyces pombe	$TTACG_{2-5}$
Protozoanlar	
Tetrahymena	TTGGGG
Dictyostelium	AG_{1-8}
Bitki	
Arabidopsis	TTTAGGG
Memeli	
İnsan	TTAGGG

Bilgi İçin

Kanser hücreleri yüksek miktarda telomeraza sahiptirler, böylece sınırsız sayıda bölünmeye rağmen kromozom uçlarını koruyabilirler. Normal somatik hücreler telomeraz aktivitesine sahip olmadıkları ve sonsuza dek bölünmedikleri için, telomerazı engelleyen ilaçlar anti-kanser ajanları olarak geliştirilmektedir. (Bkz. Bölüm 19.)



Şekil 6.28 Telomerin yapısı Telomer DNA'sı kendi üzerine dönerek dairesel bir yapı oluşturur ve kromozom uçlarını koruyan bir protein kompleksi (shelterin) ile birleşir.

ÖZET

Ökaryotik Genlerin Yapısı

- ***İntronlar ve ekzonlar:*** Ökaryotik genlerin çoğu bölünmüş bir yapıdadır; kodlayan dizi bölümleri (ekzonlar) kodlamayan diziler (intronlar) tarafından kesintiye uğratılmışlardır. Karmaşık ökaryotlarda intronlar ekzonların 10 katından daha fazla DNA'ya karşılık gelmektedir.

- ***İntronların rolleri:*** mRNA'lardan çıkarılıyor olmalarına rağmen, intronların birden çok hücresel rolü vardır. Bazı genler, daha büyük genlerin intronları içinde kodlanırlar. Ayrıca, intronlar düzenleyici diziler içerir ve alternatif kesilip-eklenmeye olanak sağlarlar.

Kodlamayan Diziler

- ***Kodlamayan RNA'lar:*** Çeşitli RNA'ların protein kodlamaktan başka fonksiyonları vardır. Bazı kodlamayan RNA'lar protein sentezinde (tRNA'lar ve rRNA'lar), mRNA kesilip-eklenmesinde ve rRNA işlenmesinde görev alırlar. Ayrıca, miRNA'lar protein sentezinin önemli düzenleyicileri iken, pek çoğu gen ekspresyonunun düzenleyicisi olarak görev yapan çok sayıda lncRNA geni saptanmıştır.

- ***Tekrarlayan diziler:*** Memeli DNA'sının %50'den fazlası yüksek tekrarlı DNA dizilerinden oluşur ki bu tekrarların bazıları genom başına 10^5 - 10^6 kopya sayısına sahiptir. Bu diziler basit-tekrar dizilerinin yanı sıra RNA ya da DNA aracılıklı yardımı ile genomda yer değiştirmiş tekrar dizilerini de içerir.

- ***Gen duplikasyonu ve psödogenler:*** Pek çok ökaryotik gen, çoklu kopyalar halinde bulunur ve atasal genlerin duplikasyonu ile ortaya çıkmış bu genler "gen aileleri" olarak bilinir. Gen ailelerinin bazı üyeleri farklı dokularda ya da gelişimin farklı aşamalarında görev alırlar. Gen ailelerinin diğer üyeleri (psödogenler) mutasyonlar tarafından etkisiz kılınmıştır ve artık fonksiyonel genler arasında yer almazlar. Gen duplikasyonları, bir DNA parçasının olabildiği gibi tüm genomun duplikasyonu ile gerçekleşebilir. İnsan genomunun yaklaşık %5'i duplike olmuş DNA bölgelerinden oluşurken, bitkilerde tüm genom duplikasyonları yaygındır. Alternatif olarak, gen duplikasyonu bir mRNA'nın tersine transkripsiyonu ve işlenmiş bir psödogenin ortaya çıkması yolu ile gerçekleşebilir.

Kromozomlar ve Kromatin

- ***Kromatin:*** Ökaryotik hücrelerin DNA'sı histonlara sarılarak nükleozomları oluşturur. Kromatin, mitoza geçiren hücrelerin yüksek seviyede yoğunlaşmış metafaz kromozomlarını da içerecek şekilde, nükleozomların üst seviyede bir yapı oluşturacak şekilde katlanmaları ile daha ileri seviyede yoğunlaşabilir. Bkz. **Animasyon 6.1** ve **Video 6.1.**

- ***Sentromerler:*** Sentromerler, mitoz sırasında kardeş kromatidlerin birbirlerine bağlandığı ve iğ iplikçiklerinin tutunduğu özelleşmiş ökaryotik kromozom bölgeleridir. Sentromer fonksiyonu, hücre bölünmesi sırasında epigenetik mekanizmalarla devamlılığı sağlanan bir H3-benzeri histon tarafından belirlenir.

- ***Telomerler:*** Telomerler ökaryotik kromozomların uçlarının korunmasına yönelik özelleşmiş dizilerdir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

gen, ekzon, intron, RNA kesilip-eklenmesi, kilobaz (kb), 5′ translasyona uğramayan bölge (UTR), 3′ translasyona uğramayan bölge (UTR)

iç içe gen, alternatif kırpılma

RNA interferens (RNAi), mikroRNA (miRNA), uzun kodlamayan RNA (lncRNA), X kromozom inaktivasyonu

basit-dizi tekrarı, satellit DNA, SINE, LINE, yer değiştirebilen eleman, retrotranspozon, retrovirüs-benzeri eleman, DNA transposon

gen ailesi, psödogen, retrotranspozisyon, işlenmiş psödogen

kromatin, histon, nükleozom, nükleozom kor partikülü, kromatozom, ökromatin, heterokromatin

sentromer, kinetokor, CENP-A, epigenetik kalıtım

telomer, telomeraz

Sorular

1. Birçok ökaryot organizmanin genom büyüklüğü karmaşıklıklarının gerektirdiğinden çok daha fazla gibidir. Bu paradoksu açıklayın.
2. Adenovirüs mRNA'sı üzerine yapılan çalışmalar sırasında intronlar ve ekzonlar nasıl bulunmuştur?
3. İnsan genomundaki intron dizileri, yaklaşık 21,000 gibi sınırlı sayıdaki genden eksprese olan protein çeşitliliğini nasıl arttırırlar?
4. Basit dizili tekrarlayan DNA, nükleer DNA'nın esas kısmından nasıl ayrılabilir?
5. Kodlamayan RNA'lar gen ekspresyonunu nasıl düzenlerler?
6. İşlenmiş bir psödogeni, DNA duplikasyonu ile oluşmuş bir psödogenden nasıl ayırabilirsiniz?
7. Maya (*S. cerevisiae*) sentromerleri tek bir mikrotübüle tutunan bir kinetokor oluştururlarken, hayvan hücrelerinin çoğunda kinetokorlara birden fazla mikrotübül tutunur. Bu farklılık, *S. cerevisiae* sentromerlerinin yapısına nasıl yansır?
8. Dairesel plazmidlere bir sentromer dizisi eklenip maya hücrelerine verilirse, bu plazmidler çoğalır ve her hücre bölünmesinde normal biçimde yavru hücrelere dağılır. Ancak, plazmid tek bir noktada bir restriksiyon endonükleaz tarafından kesilip doğrusal (lineer) bir kromozom oluşturulur ise, plazmid genleri kısa sürede mayadan kaybolur. Açıklayınız. Önerdiğiniz açıklamayı test etmek için nasıl bir deney gerçekleştirebilirsiniz?
9. Maya genomik DNA'sına yaklaşık kaç histon H_1 molekülü bağlıdır?
10. Bir insan genindeki intronun ortalama uzunluğu nedir?
11. Tüm insan cDNA'larını içeren bir plazmid vektör kütüphanesi yaptınız. Beklenen ortalama "insert" uzunluğu nedir?
12. Neden pek çok bitki türü insandan daha çok sayıda gene sahiptir?

Atıf

Hücre
Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

(Her ana bölüm için en önemli derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Ökaryotik Genlerin Yapısı

Ben-Dov, C., B. Hartmann, J. Lundgren and J. Valcarel. 2008. Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 283: 1229-1233. [R]

Berget, S.M., C. Moore and P. A. Sharp. 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad.* Sci. USA 74: 3171-3175. [P]

Chorev, M. and L. Carmel. 2012. The function of introns. *Front. Genet.* 3: 55. [R]

Chow, L. T., R. E. Gelinas, T. R. Broker and R. J. Roberts. 1977. An amazing sequence arrangement at the 5′ ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12: 1-8. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-945. [P]

Kumar, A. 2009. An overview of nested genes in eukaryotic genomes. *Eukaryotic Cell* 8: 1321-1329. [R]

Nilsen, T. W. and B. R. Graveley. 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463: 457-463. [R]

The ENCODE Project Consortium. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57-74. [P]

Tilghman, S. M., P. J. Curtis, D. C. Tiemeier, P. Leder and C. Weissmann. 1978. The intervening sequence of a mouse β-globin gene is transcribed within the 15S β-globin mRNA precursor. *Proc. Natl. Acad.* Sci. USA 75: 1309-1313. [P]

Kodlamayan Diziler

Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233. [R]

Cordaux, R. and M.A. Batzer. 2009. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Rev. Genet.* 10: 691-703. [R]

Fatica, A. and I. Bozzoni. 2014. Long noncoding RNAs: new players in cell differ entiation and development. *Nature Rev. Genet.* 15: 7-21. [R]

Guttman, M, J. and 16 others. 2011. linc RNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 477: 295-300. [P]

Inui, M., M. Graziano and S. Piccolo. 2010. MicroRNA control of signal transduction. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 11: 252-263. [R]

Iyer, M. K. and 18 others. 2015. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nature Genet.* 47: 199-208. [P]

Kazazian, H. H., Jr. 2004. Mobile elements: Drivers of genome evolution. *Science* 303: 1626-1632. [R]

Kugel, J. F. and J. A. Goodrich. 2011. Noncoding RNAs: key regulators of mammalian transcription. *Trends Biochern. Sci.* 37: 144-151. [R]

Lee, E. and 16 others. 2012. Landscape of somatic retrotransposition in human cancers. *Science* 337: 967-971. [P]

Nagano, T. and P. Fraser. 2011. No-nonsense functions for long noncoding RNAs. *Cell* 145: 178-181. [R]

Parker, H. G. and 16 others. 2009. An expressed *Fgf4* retrogene is associated with breed-defining chrondrodysplasia in domestic dogs. *Science* 325: 995-998. [P]

Pennisi, E. 2011. Green genomes. *Science* 332: 1373-1375. [R]

Shukla, R. and 22 others . 2013. Endogenous retrotransposition activates oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. *Cell* 153: 101-111. [P]

Sutter, N. B. and 20 others. 2007. A single *IGF1* allele is a major determinant of small size in dogs. *Science* 316: 112-115. [P]

The ENCODE Project Consortium. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57-74. [P]

Ulitsky, I. and D. P. Bartel. 2013. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell* 154: 26-46. [R]

Wang, K. C. and H. Y. Chang. 2011. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol. Cell* 43: 904-914. [R]

Yang, L., J. E. Froberg and J. T. Lee. 2014. Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world. *Trends Biochem. Sci.* 39: 35-43. [R]

Zhang, Z. and M. Gerstein. 2004. Large-scale analysis of pseudogenes in the human genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14: 328-335. [R]

Kromozomlar ve Kromatin

Allshire, R. C. and G. H. Karpen. 2008. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nature Rev. Genet.* 9: 923-937. [R]

Black, B. E. and E. A. Bassett. 2008. The histone variant CENP-A and centromere specification . *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 91-100 [R]

Blackburn, E. H. 2005. Telomeres and telomerase: Their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Letters* 579: 859-862. [R]

Blasco, M. A. 2007. Telomere length, stem cells and aging. *Nature Chem. Biol.* 3: 640-649. [R]

Espinoza, C. A. and B. Ren. 2011. Mapping higher order structure of chromatin domains. *Nature Genet.* 43: 615-616. [R]

Gilson, E. and V. Geli. 2007. How telomeres are replicated. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 825-838. [R]

Jain, D. and J. P. Cooper. 2010. Telomeric strategies: means to an end. *Ann. Rev. Genet.* 44: 243-269. [R]

Kornberg, R. D. 1974. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* 184: 868-871. [P]

Lampert, F. and S. Westermann. 2011. A blueprint for kinetochores–new insights into the molecular mechanics of cell division. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 407-412. [R]

Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature* 389: 251-260. [P]

Morris, C. A. and D. Moazed. 2007. Centromere assembly and propagation. *Cell* 128: 647-650. [R]

Ohta, S., L. Wood, J. -C. Bukowski-Wills, J. Rappsilber and W. C. Earnshaw. 2011. Building mitotic chromosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23: 114-121. [R]

O'Sullivan, R. J. and J. Karlseder. 2010. Telomeres: protecting chromosomes against genomic instability. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 171-181. [R]

Paulson, J. R. and U. K. Laemmli. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12: 817-828. [P]

Tremethick, D. J. 2007. Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell* 128: 651-654. [R]

Van Holde, K. and J. Zlatanova. 2007. Chromatin fiber structure: where is the problem now? *Sem. Cell Dev. Biol.* 18: 651-658. [R]

Verdaasdonk, J. S. and K. Bloom. 2011. Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 320-332. [R]

BÖLÜM 7

Genomik DNA'nın Replikasyonu, Korunması ve Yeniden Düzenlenmesi

DNA Replikasyonu 217

DNA Tamiri 232

DNA Yeniden Düzenlenmeleri 243

Moleküler Tıp

Kolon Kanseri ve DNA Onarımı 241

Anahtar Deney

İmmünglobulin Genlerinin Yeniden Düzenlenmesi 246

Üremenin temel biyolojik süreci atadan döle genetik bilginin tam ve doğru olarak aktarılmasını gerektirir. Bu nedenle, genomik DNA'nın doğru replikasyonu bütün hücre ve organizmaların yaşamları için vazgeçilmezdir. Hücre her bölünmesinde genomunu iki katına çıkarmalıdır. Ökaryot ve prokaryotlarda kromozomları oluşturan büyük DNA moleküllerinin kopyalanması için karmaşık enzimatik mekanizmalar gereklidir. Ek olarak, hücreler radyasyon gibi çevresel ajanlardan kaynaklanan DNA hasarının onarımı ve bazen DNA replikasyonu sürecinde oluşan hataların düzeltilmesini sağlayacak mekanizmalar da geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardaki bozukluklar genomik DNA'nın korunması ve doğru kopyalanmasında yetersizliğe yol açar. Bu tip bir yetersizlik kanser oluşumu gibi kötü sonuçlar doğurabilir.

Hatasız DNA replikasyonunun ve korunmasının önemine rağmen, hücre genomları statik olmaktan çok uzaktır. Türlerin evrimleşmesi için, mutasyonlar ve genlerin yeniden düzenlenmeleriyle, bireyler arasında genetik çeşitliliğin korunması gerekir. Genom içerisindeki DNA dizilimlerinin yeniden düzenlenmesinin de, yeni genetik bilgi bileşimleri oluşturarak, evrime katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bazı DNA yeniden düzenlenmeleri, hücre ya da organizmaların farklılaşma ve gelişim süreçlerinde gen ekspresyonlarını düzenlemek üzere programlanmıştır. İnsanlarda, öne çıkan bir örnek, immün sistemin gelişimi sürecinde antikor genlerinin yeniden düzenlenmesidir. O halde, genetik bilginin korunması ile değişmesi arasındaki hassas denge, bireysel organizmaların gelişimi kadar türlerin evrimi açısından da kritiktir.

DNA'nın Replikasyonu

Bölüm 4'de anlatıldığı gibi, DNA replikasyonu, her bir atasal ipliğin yeni, tamamlayıcı iplik için kalıp oluşturduğu yarı korunumlu bir süreçtir. Yeni sentezlenen DNA ipliğine deoksiribonükleozid trifosfatların (dNTP'ler) eklenmesini katalizleyen DNA polimeraz, replikasyondan sorumlu asıl enzimdir. Bununla beraber, DNA replikasyonu tek bir enzimatik reaksiyondan çok daha karmaşıktır. Başka proteinler de rol oynar ve hücre çoğalmasında gerekli olan düşük hata sıklığıyla bağdaşabilecek, replikasyon doğruluğunu garantileyecek hata düzeltme (*proofreading*) mekanizmaları gerekmektedir. Ökaryotik kromozomlarda hem replikasyonun başlaması ve hem de kromozom uçlarının kopyalanması için de ilave proteinler ve özgün DNA dizileri gereklidir.

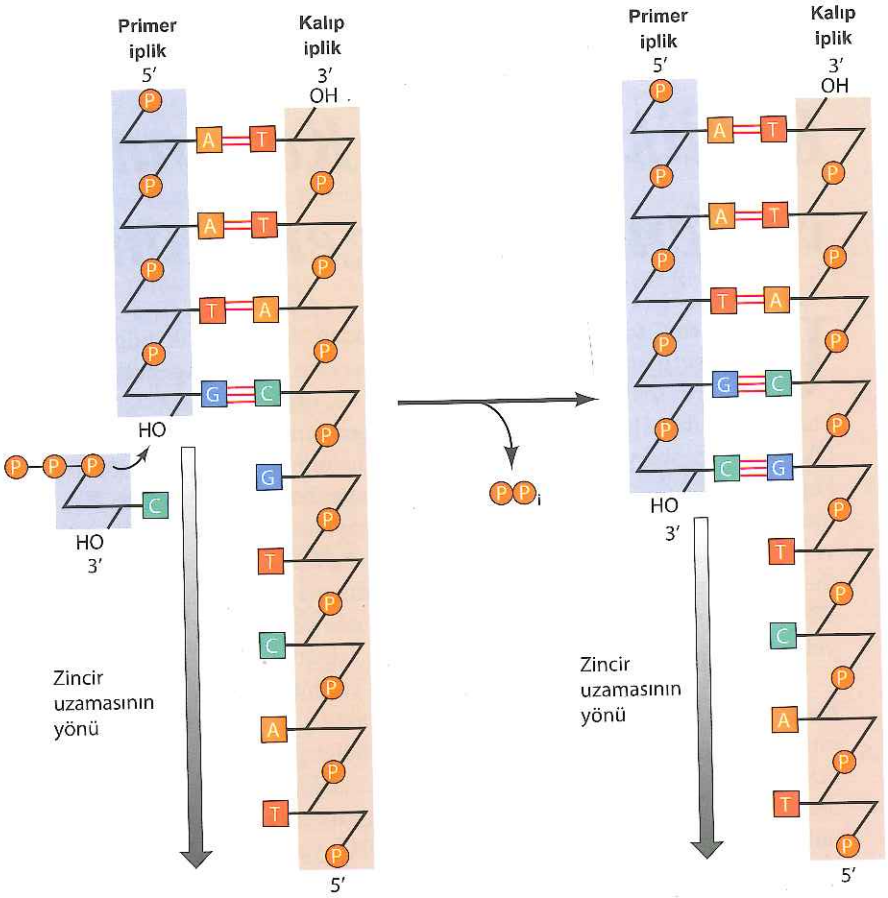
Video 7.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v7.1

DNA Replikasyonunun Mekanizması DNA replikasyonu esnasında, iki farklı mekanizma ile çift sarmalın her iki ipliğide, yeni DNA moleküllerinin oluşumunda kalıp olarak görev yapar.

DNA polimerazlar

DNA polimeraz ilk kez, 1956'da Arthur Kornberg tarafından *E. coli* özütlerinde tanımlandı. Bu enzimin izolasyonu, ilk olarak Watson ve Crick tarafından öne sürülmüş olan DNA replikasyonu modelinin biyokimyasal temellerini sağlayacak biçimde, bir DNA kalıbını doğru şekilde kopyalayabildiği yeteneği nedeniyle,



Şekil 7.1 DNA polimeraz tarafından katalizlenen reaksiyon Bilinen tüm DNA polimerazlar, uzayan DNA ipliğinin 3′ hidroksil ucuna (primer iplik), bir deoksiribonükleotid trifosfat eklerler.

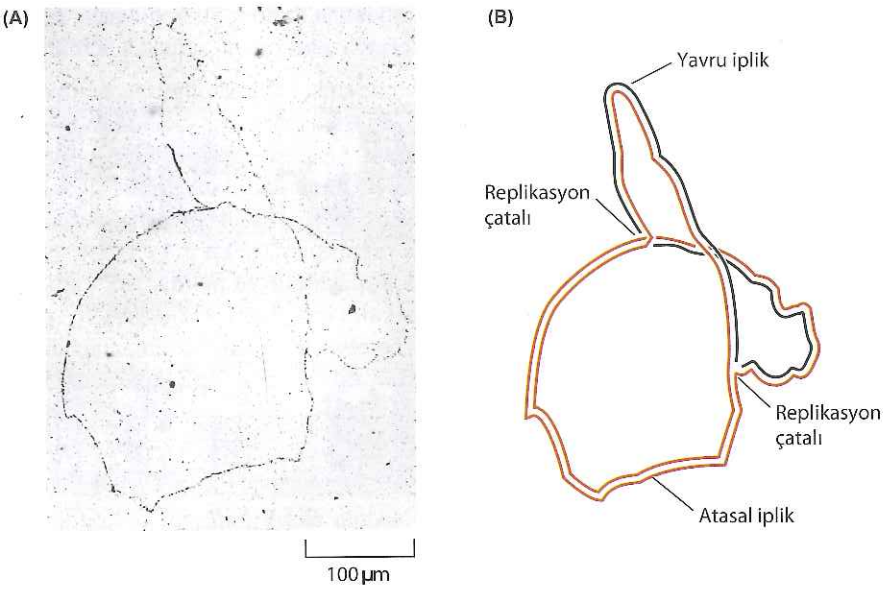
moleküler biyolojide bir dönüm noktası olmuştur. İronik olarak, ilk kez tanımlanan bu DNA polimeraz (şimdi DNA polimeraz I olarak adlandırılmaktadır) *E. coli* DNA replikasyonundan sorumlu olan asıl enzim değildir. Aslında, polimeraz I esas olarak hasarlı DNA'nın tamirinde rol almaktadır. Günümüzde, hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerin DNA replikasyon ve tamirinde değişik rolleri olan, birden fazla farklı DNA polimeraz içerdikleri açıkça bilinmektedir. Bakteride DNA polimeraz III DNA replikasyondan sorumlu ana polimerazdır. Ökaryotik hücrelerde nükleer DNA'nın replikasyonunda görevli üç DNA polimeraz (α, δ ve ε) vardır. Diğer bir DNA polimeraz (γ) mitokondriye bulunur ve mitokondriyal DNA'nın replikasyonundan sorumludur.

Bilinen tüm DNA polimerazlar, DNA replikasyonu için kritik etkileri olan iki temel özelliği paylaşırlar (Şekil 7.1). İlk olarak, tüm polimerazlar, uzayan zincirin 3′ hidroksil grubuna bir dNTP ekleyerek, DNA'yı 5′den 3′e yönünde sentezlerler. İkincisi, DNA polimerazlar yeni deoksiribonükleotidi daha önceden sentezlenen ve kalıp ipliğe hidrojen bağı ile bağlı primer ipliğine ekleyebilirler, serbest dNTP'lerin polimerizasyonunu katalizleyerek "*de novo*" DNA sentezini başlatamazlar. DNA polimerazlar bu açıdan, primerler olmadan yeni RNA ipliğini sentezleyebilen RNA polimerazlardan farklıdırlar. Bu bölümün ileriki kısımlarında tartışacağımız gibi, DNA polimerazların bu özellikleri, hücre üremesi için gerekli olan DNA replikasyonundaki yüksek doğruluğunun korunması için çok önemlidir.

Replikasyon çatalı

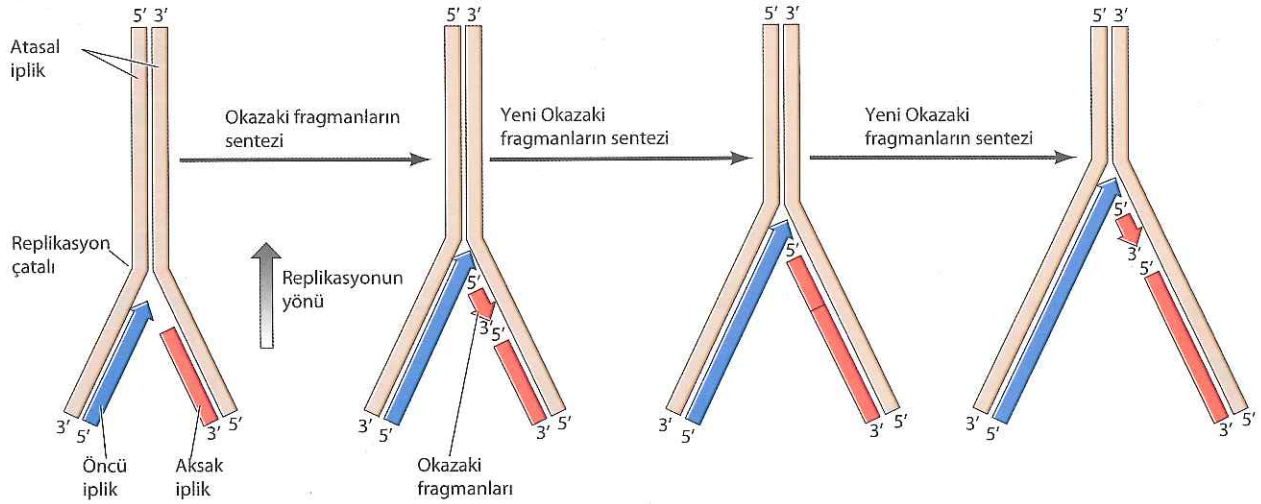
Replikasyon sürecindeki DNA molekülleri, ilk kez John Cairns tarafından, yeni sentezlenen DNA'nın daha sonra görüntülenebilmesine olanak veren, radyoaktif timidin varlığında üretilmiş *E. coli*'de otoradyografi ile gözlendi (Şekil 7.2). Bazı durumlarda replikasyon sürecinde tam çembersel moleküller gözlenebiliyordu. Bu DNA molekülleri, aktif DNA sentezinin olduğu bölgeleri gösteren, iki **replikasyon çatalı** içeriyordu. Her çatalda, DNA'nın atasal iplikleri ayrılıyor ve iki yeni yavru iplik sentezleniyordu.

Atasal molekülün her iki ipliğine tamamlayıcı, yeni DNA ipliklerinin sentezi, DNA replikasyonunun biyokimyasının anlaşılmasında önemli bir problemi ortaya çıkardı. Çift sarmal DNA'nın iki ipliğinin zıt (anti paralel) yönlenimi nedeniyle, replikasyon çatalında iki yeni ipliğin kesintisiz sentezi, bir ipliğin 5′den 3′e doğrultusunda sentezlenirken, diğerinin ters doğrultuda (3′den 5′e) sentezlenmesini gerektirmektedir. Fakat DNA polimeraz, dNTP'lerin polimerizasyonunu yalnızca 5′den 3′e doğrultusunda katalizlemektedir. Peki o halde, DNA'nın diğer yeni ipliği nasıl sentezlenebilir?



Şekil 7.2 ***E. coli*** **DNA'sının replikasyonu** A) [^{3}H] timidin varlığında iki jenerasyon üretilmiş olan bakterinin işaretli DNA molekülü daha sonra izole edilip fotoğraf filmine maruz bırakılarak görüntülendi. (B) (A)'da gösterilen iki replikasyon çatalının şematik gösterimi. (J. Cairns,1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant, Biol.* 28:43)

Bu gizem, DNA ipliklerinden yalnızca *birinin* genel DNA replikasyonu yönünde, sürekli olarak sentezlendiğinin, diğer ipliğin ise replikasyon çatalının hareket yönüne ters yönde, kesintili DNA parçaları (1-3 kb) şeklinde sentezlendiğini gösteren deneylerle çözümlenmiştir (Şekil 7.3). Yeni sentezlenen bu küçük DNA parçaları (Japon biyokimyacısı Reiji Okazaki tarafından keşfedildiğinden **Okazaki fragmanları** olarak adlandırılır), kesintisiz yeni bir DNA ipliği oluşturmak üzere **DNA ligaz** tarafından birbirine bağlanır. Okazaki fragmanlarının (**aksak iplik**) sentezi

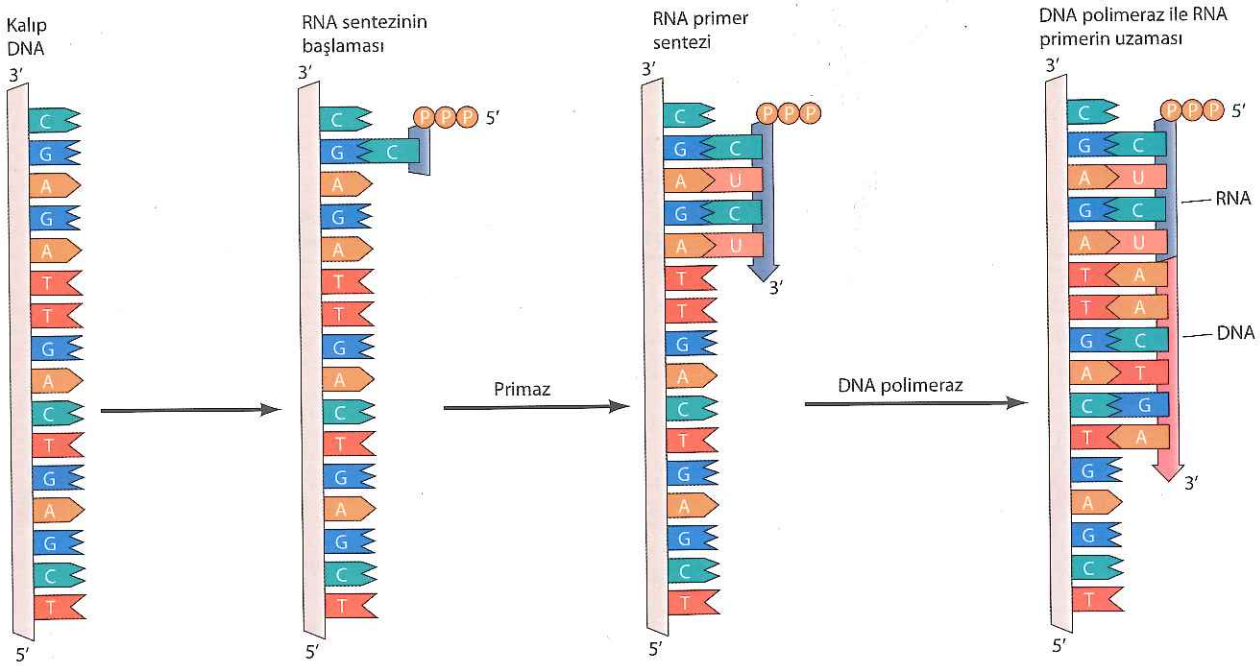


Şekil 7.3 **Aksak ve öncü DNA ipliklerinin sentezi** Öncü iplik, replikasyon çatalının hareket yönünde sürekli sentezlenir. Aksak iplik replikasyonun genel yönünün tersine küçük parçalar (Okazaki fragmanları) halinde sentezlenir. Okazaki fragmanları daha sonra DNA ligaz ile birleştirilirler.

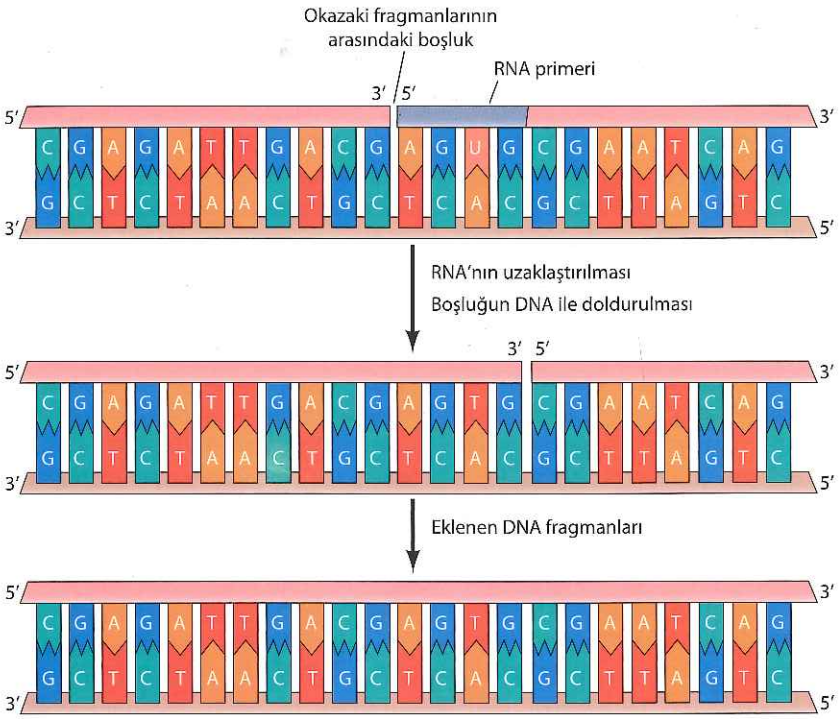
için kullanılan kalıp iplik, replikasyon çatalının hareket yönüne doğru uzamasıyla ortaya çıktığı için, sentezin sürekli olduğu ipliğe **öncü iplik** denir.

Her ne kadar, aksak ipliğin sentezinin kesintili olduğunun keşfi, replikasyon çatalında DNA'nın her iki ipliğinin uzama mekanizmasını açıklasa da, başka bir soruyu gündeme getirir: DNA polimeraz primere gereksinim duyduğu ve sentezi *de novo* başlatamadığına göre, Okazaki fragmanlarının sentezi nasıl başlatılır? Yanıt, kısa RNA parçalarının DNA replikasyonu için primer olarak görev yapmasıdır (Şekil 7.4). DNA sentezinin aksine, RNA sentezi *de novo* olarak başlayabilir ve **primaz** adı verilen enzim, replikasyon çatalında aksak ipliğin kalıbına tamamlayıcı, kısa RNA parçaları (üç ile on nükleotid uzunlukta) sentezleyebilir. Okazaki fragmanları daha sonra, DNA polimerazın bu RNA primerlerini uzatması ile sentezlenir. RNA primer kullanımının bir önemli sonucu, yeni sentezlenen Okazaki fragmanlarının RNA-DNA bağlantıları barındırmasıdır ki, bunların keşfi, DNA replikasyonunda RNA primerlerinin kullanıldığına önemli bir kanıt sağlamıştır.

DNA'nın aksak ipliğinin devamlılığının sağlanması için eninde sonunda Okazaki fragmanlarından RNA primerlerinin kaldırılması ve DNA ile yer değiştirmesi gerekir (Şekil 7.5). Prokaryotlarda RNA primerleri polimeraz I tarafından kaldırılırlar. Polimeraz I'in DNA polimeraz aktivitesinin yanında, DNA'yı (ya da RNA'yı) hem 3′den 5′e hem de 5′den 3′e yönünde hidroliz edebilen **ekzonükleaz** aktivitesi de bulunur. DNA polimeraz I'in 5′den 3′e ekzonukleaz aktivitesi, Okazaki parçalarının 5′ ucundan nükleotidleri kaldırıp yerlerine deoksinükleotidlerin yerleşmesine izin vererek, tamamen DNA içeren parçaların oluşmasını sağlar. Ökaryotik hücrelerde RNA primerleri RNA-DNA hibritlerindeki RNA ipliğini parçalayan **RNaz H** ve bir 5′den 3′e ekzonükleaz'ın birlikte çalışmasıyla ortadan kaldırılır. Oluşan boşluklar daha sonra DNA polimeraz δ tarafından doldurulur ve DNA parçaları DNA ligaz ile



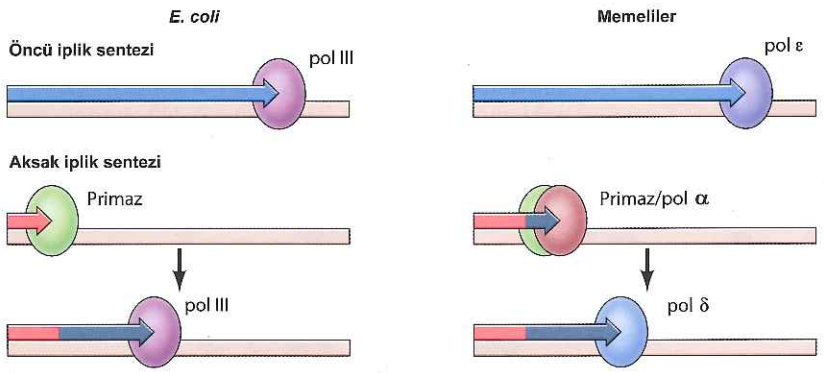
Şekil 7.4 Okazaki fragmanlarının RNA primerleri ile başlatılması Kısa RNA parçaları DNA polimeraz tarafından uzatılabilen primerler olarak görev yapar.



Şekil 7.5 RNA primerlerin ortadan kaldırılması ve Okazaki fragmanlarının birleştirilmesi RNA primerleri kaldırılırlar ve DNA polimeraz Okazaki fragmanları arasındaki boşlukları DNA ile doldurur. Ortaya çıkan DNA parçaları DNA ligaz ile birleştirilir.

birleştirilerek tam bir aksak iplik oluşması sağlanır.

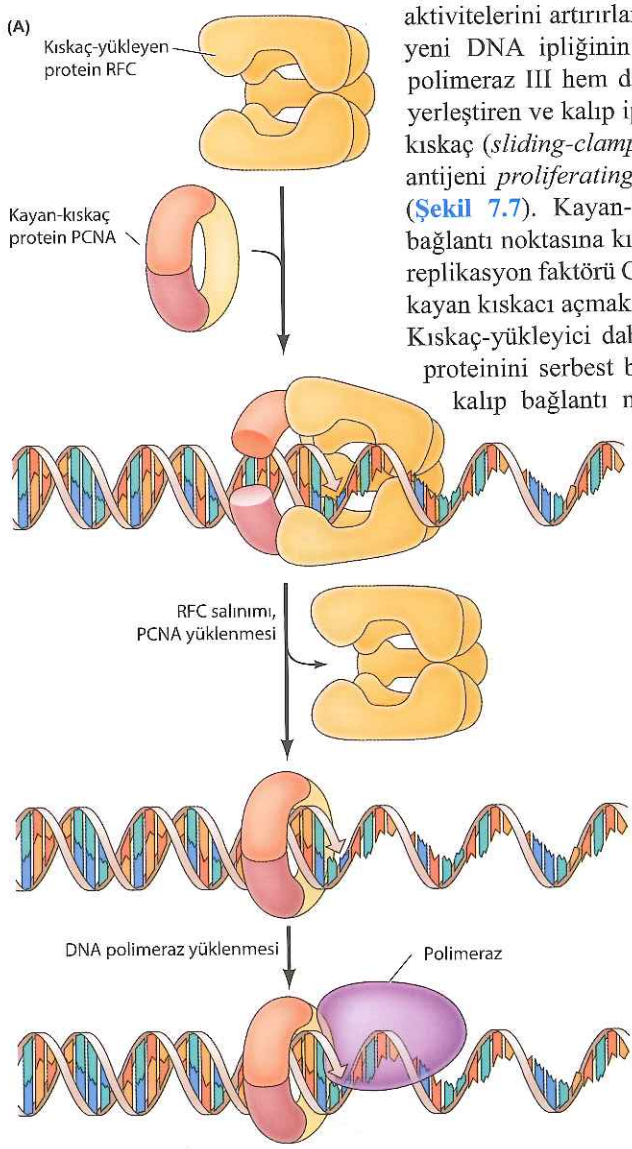
Daha önce belirtildiği üzere, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda farklı DNA polimerazlar replikasyon çatalında değişik rollere sahiptirler (Şekil 7.6). *E. coli*'de, polimeraz III, hem DNA'nın öncü ipliğinin hem de Okazaki parçalarının sentezlenmesini RNA primerlerini uzatarak sağlayan ana replikatif polimerazdır. Ökaryotik hücrelerde, nükleer DNA'nın replikasyonunda üç farklı DNA polimeraz (α, δ ve ε) görev alır. Bu DNA polimerazların rolleri iki tip deneyle incelenmiştir. İlk olarak, SV40 gibi bazı hayvan virüslerinin DNA replikasyonunun, hücresiz



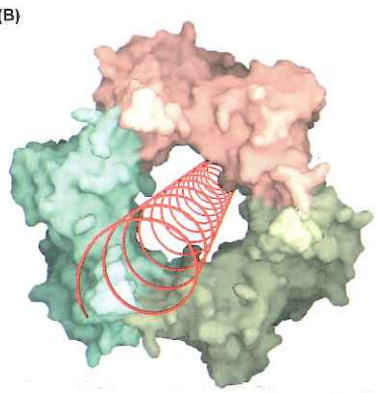
Şekil 7.6 DNA polimerazların *E. coli* ve memeli hücrelerinde rolleri Sürekli iplik *E. coli*' de polimeraz III (pol III) memeli hücrelerinde polimeraz ε (pol ε) tarafından sentezlenir. *E. coli*' de aksak ipliğin sentezi primaz tarafından başlatılır ve RNA polimerler polimeraz III ile uzatılırlar. Memeli hücrelerde, aksak ipliğin sentezi primaz kompleksi ile polimeraz α (pol α) tarafından başlatılır. Bu kompleks tarafından sentezlenen kısa RNA-DNA parçaları daha sonra polimeraz δ tarafından uzatılır.

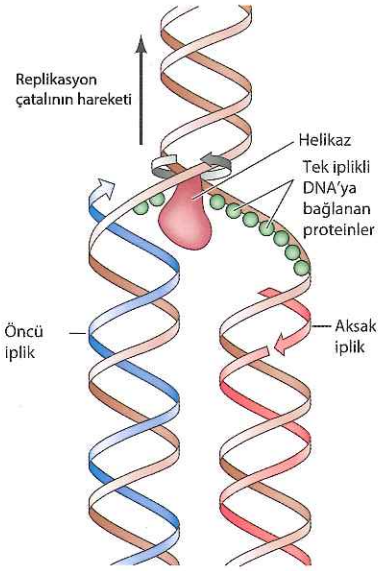
olmayan ekstrelerde (özüt) çalışılabilmesi, farklı DNA polimerazların yanı sıra, DNA replikasyonunda görev alan diğer proteinlerin aktivitelerininde, doğrudan biyokimyasal analizlerlerine olanak sağlamıştır. İkincisi, α, δ ve ε polimerazların memeli hücrelerinin yanı sıra mayalarda da bulunması, maya genetiğinin güçlü yaklaşımlarını kullanarak bu proteinlerin biyolojik rollerinin test edilmesini sağlamıştır (Bkz. Bölüm 4). Biyokimyasal analizler sonucunda polimeraz α'nın primaz ile birlikte bir kompleks halinde bulunduğu, aksak ipliğin sentezinde ve replikasyon orijinlerinde RNA-DNA kısa fragmanların sentezinde, primaz ile birlikte çalıştığı gösterilmiştir. Polimeraz δ ve ε ise temel replikatif polimerazlar olup, sırasıyla aksak ve öncü ipliğin sentezinden sorumludurlar.

Replikasyon çatalında, polimerazlar ve primaz dışında başka proteinler de görev alır. Bu ek proteinler, DNA replikasyonu hasarlı *E. coli* ve maya mutantlarının analizi ile ve SV40 DNA'sının *in vitro* replikasyonu için gerekli memeli proteinlerinin saflaştırılması ile tanımlanmışlardır. Replikasyon için gerekli proteinlerin bir grubu, DNA polimerazlara bağlanarak polimerazların aktivitelerini artırırlar ve onların kalıp DNA'ya bağlı kalmalarına yol açarak, yeni DNA ipliğinin sentezine devam etmelerini sağlarlar. Hem *E. coli* polimeraz III hem de ökaryot polimeraz δ ve ε, polimerazı primer üzerine yerleştiren ve kalıp iplikle kararlı bir bağlantı oluşturmasını sağlayan kayan-kıskaç (*sliding-clamp*) proteinleri (ökaryotlarda prolifere olan hücre nükleer antijeni *proliferating cell nuclear antigen* [PCNA]) ile ilişki halindedirler. (Şekil 7.7). Kayan-kıskaç proteinler primer ve kalıp DNA arasındaki bağlantı noktasına kıskaç-yükleyen (*clamp-loading*) proteinler (ökaryotlarda replikasyon faktörü C [RFC]) tarafından yüklenir. Kıskaç-yükleyen proteinler kayan kıskacı açmak için ATP hidrolizinden elde ettikleri enerjiyi kullanırlar. Kıskaç-yükleyici daha sonra DNA etrafında halka oluşturan kayan-kıskaç proteinini serbest bırakır. Kayan-kıskaç proteini DNA polimerazı primer-kalıp bağlantı noktasındaki DNA'ya yükler. Kayan-kıskaç tarafından oluşturulan halka, replikasyon ilerlerken polimerazın



Şekil 7.7 Polimeraza yardımcı proteinler
(A) Kıskaç-yükleyen ve kayan-kıskaç proteinleri (memeli hücrelerinde sırasıyla RFC ve PCNA) primer ve kalıp bağlantı noktasındaki DNA' ya bağlanır. RFC, PCNA' yı DNA' ya yükledikten sonra serbest bırakılır. Daha sonra DNA polimeraz PCNA'ya bağlanır. (B) DNA' ya bağlanmış PCNA modeli. (B, T. S. Krishna et al., 1994, *Cell* 79:1233 'dan)



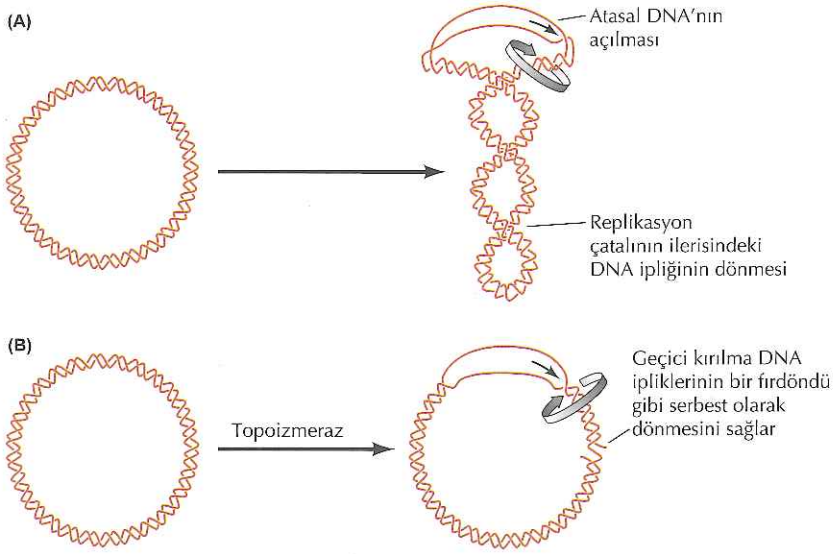


Şekil 7.8 Helikazların çalışması ve tek iplikli DNA'ya bağlanma hareketi Helikazlar, replikasyon çatalının ilerisinde, iki atasal DNA ipliğini açarlar. Açılan DNA iplikleri, daha sonra yeni DNA' nın sentezine kalıplık yapabilmeleri için, tek iplik DNA' ya bağlanan proteinler sayesinde stabilize edilirler.

kalıp ile ilişkisinin korunmasını sağlar ve böylece, binlerce nükleotidlik DNA'nın kesintiye uğramadan sentezlenmesine olanak verir.

Diğer proteinler kalıp DNA'yı açar ve tek iplikli bölgeleri sağlamlaştırırlar (Şekil 7.8). **Helikazlar,** replikasyon çatalının ilerisinde ATP'nin yardımı ile atasal DNA'nın açılmasını katalizleyen enzimlerdir. **Tek iplikli DNA'ya bağlanan proteinler** (örn., ökaryot replikasyon faktörü A [RFA]) açılan kalıp DNA'yı sabitleyerek, DNA polimeraz tarafından kopyalanacak şekilde tek iplik halinde kalmasını sağlarlar.

Atasal DNA iplikleri çözüldükçe, replikasyon çatalının ilerisindeki DNA dönmekte zorlanır. Bu dönüş engellenmediğinde, çembersel DNA (SV40 DNA'sı veya *E. coli* kromozomu gibi) kendi üzerine kıvrılır, sonunda replikasyonu durdurur (Şekil 7.9). Bu problem, DNA ipliklerinin geri dönüşümlü olarak kırılıp yeniden bağlanmasını katalizleyen enzimler, **topoizomerazlar** tarafından çözülür. Bu enzimler iki tiptir: Tip I topoizomerazlar DNA'nın sadece tek ipliğini kırarlar; tip II topoizomerazlar her iki iplikte eş zamanlı kırık oluştururlar. Tip I ve II topoizomerazlar tarafından oluşturulan kırıklar bir "fırdöndü" gibi kalıp DNA'nın iki ipliğinin



Şekil 7.9 DNA replikasyonu sırasında topoizomerazların rolü (A) Kalıp DNA' nın iki ipliği açılınca, replikasyon çatalının ilerisindeki DNA zıt yönde dönmekte zorlanır ve çembersel moleküllerin kendi üzerlerine katlanmalarına neden olur. (B) Bu problem, DNA ipliklerinin geri dönüşümlü olarak kırılıp yeniden birleşmelerini sağlayan topoizomerazlar tarafından çözülür. Bu enzimler tarafından oluşturulan geçici kırıklar, DNA' nın iki ipliğinin birbirleri etrafında serbestçe dönmesine olanak veren bir fırdöndü gibi rol oynar.

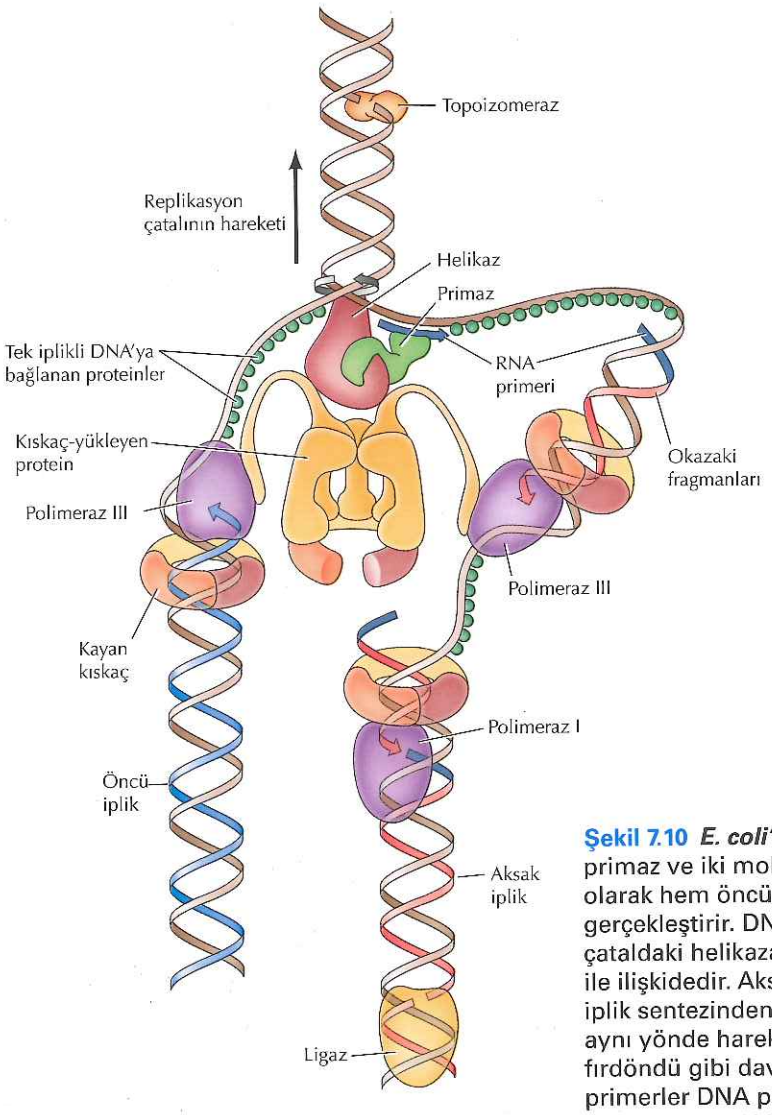
Bilgi İçin

Topoizomeraz II'nin inhibitörü, etoposit denilen ilaç, birçok kanser tipinin tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanılır (bkz. Bölüm 19).

Animasyon 7.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a7.1
DNA Replikasyon Çatalı Helikaz, primaz ve DNA polimeraz III ' ün iki molekülü, DNA replikasyon çatalındaki DNA'nın hem öncü hem de aksak ipliğinin eşgüdümlü olarak sentezini gerçekleştirir.

birbirlerinin etrafında serbest bir şekilde dönmesini sağlayarak, çatalın ilerisindeki DNA'nın kendi üzerine kıvrılmasını engeller (bkz. Şekil 7.9). Her ne kadar ökaryot kromozomları çembersel değil, doğrusal DNA molekülleri içerse de, replike olmaları topoizomerazları gerektirmektedir. Aksi taktirde, DNA sentezi sırasında kromozomların tamamının sürekli olarak dönmesi gerekirdi.

Tip II topoizomeraz sadece DNA'nın açılması için değil, aynı zamanda, birbirinin içine geçmiş olan yeni sentezlenmiş çembersel DNA moleküllerinin birbirinden ayrılması için de gereklidir. Ökaryot hücrelerde topoizomeraz II'nin mitotik kromozomların yoğunlaşmasında gerekli olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca, maya mutantları, insan ve *Drosophila* ile yapılan araştırmalar, topoizomeraz II'nin, mitozda kardeş kromatidlerin ayrılması için gerekli olduğunu göstermiştir ki bu, ökaryot kromozomlarında yeni replike olmuş DNA ilmeklerinin çözülmesinde bu enzimin görevli olabileceğini göstermektedir.



DNA replikasyonunda yer alan enzimler, replikasyon çatalında DNA'nın aksak ve öncü ipliklerinin her ikisini eş zamanlı olarak sentezlemek üzere, işbirliği yaparlar (**Şekil 7.10**). Bu görev, replikatif DNA polimeraz çiftlerinin ve aynı zamanda çatalda bulunan helikaz ile de etkileşen kıskaç-yükleyen yardımcı proteinlerinin birlikteliği ile başarılır. Daha sonra, polimerazlardan biri öncü ipliği sentezlerken diğeri aksak ipliği sentezler. Aksak iplik kalıbı replikasyon çatalında öyle bir katlanır ki, aksak ipliğin sentezinden sorumlu polimeraz alt birimi ile öncü ipliği sentezleyen diğer alt birim aynı yönde hareket eder. Aksak ipliğin polimerazı bir Okazaki fragmanının sonuna ulaştığında DNA'dan ayrılır. Kıskaç yükleyiciye bağlı olduğu için, diğer bir Okazaki fragmanının sentezini başlatmak için, primer-kalıp kavşağındaki yeni kayan kıskaca etkin bir biçimde tekrar yüklenebilir.

Şekil 7.10 *E. coli'deki* replikasyon çatalı modeli Helikaz, primaz ve iki molekül DNA polimeraz III, koordineli olarak hem öncü hem de aksak DNA ipliklerinin sentezini gerçekleştirir. DNA polimerazın her iki molekülü de çataldaki helikaza bağlı olan kıskaç–yükleyen protein ile ilişkidedir. Aksak iplik kalıbı öyle bir katlanır ki, aksak iplik sentezinden sorumlu polimeraz çatalın hareketiyle aynı yönde hareket eder. Topoizomerazlar çatalın önünde fırdöndü gibi davranırlar. Çatalın arkasında, RNA primerler DNA polimeraz I ile ortadan kaldırılır ve Okazaki fragmanları DNA ligaz ile tekrar birleştirilir.

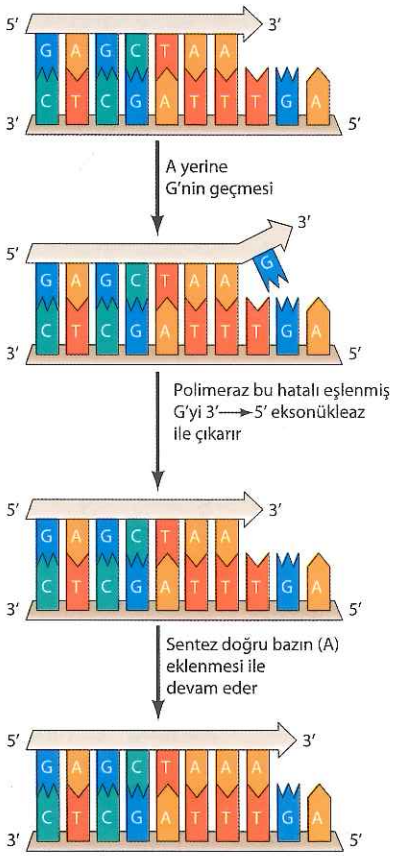
Ökaryotik hücrelerde, DNA replikasyonu esnasında nükleozomlar da yıkılırlar. Atasal kromatinin nükleozomları iki kardeş DNA ipliği arasında paylaşılır ve nükleozomların yeniden yapılanması için gereken histonların eklenmesi, replikasyon çatalı ile birlikte hareket eden ilave proteinler (kromatin yapılanma faktörleri) vasıtasıyla gerçekleşir.

Replikasyonun doğruluğu

DNA replikasyonunun hatasız olması, hücrenin çoğalma süreci açısından önemlidir ve değişik genler için mutasyon oranı hesapları, replikasyon sırasında hata olasılığının, eklenen her 10^9 baz için sadece bir yanlış baz olduğunu göstermiştir. Bu hata frekansı tamamlayıcı baz eşleşmesi temeline bakıldığında, beklenenden çok daha düşüktür. Özellikle, doğru eşleşen ve yanlış eşleşen bazlar arasında farklı hidrojen bağlarının serbest enerji değişimi, doğru baz eşleşmesi oluşumunu yaklaşık yüz kat artıracak destekleyecek kadar büyüktür. Sonuçta baz seçimi basitçe, tamamlayıcı bazlar arasındaki hidrojen bağları tarafından belirlenir. Bunun sonucunda yeni sentezlenen DNA'da hata sıklığı: yaklaşık her 100 nükleotidde bir yanlış bazın eklenmesine karşılık gelir. Daha yüksek oranlarda elde edilen doğruluk, büyük oranda DNA polimerazın aktiviteleri ile sağlanmaktadır.

DNA polimerazın replikasyonun doğruluğunun artırma mekanizmalarından biri, yeni sentezlenen DNA'ya eklenecek doğru bazın seçimine yardım etmektir. DNA polimeraz sadece kalıp ipliğe hidrojen bağıyla herhangi bir nükleotidin eklenmesini katalizlemez. Doğru bir baz eşleşmesi konformasyonuna uyum göstererek, yanlış baz eklenmesini aktif olarak ayırt eder. Örnek olarak, bazı DNA polimerazlarla yakın zamanda yapılan yapısal analizler doğru olarak eşleşmiş dNTP'lerin, DNA polimerazda konformasyonel değişiklikleri uyararak, nükleotidin DNA'ya eklenmesine yol açtığını göstermiştir. DNA polimerazın, eklemek için eşleşmiş nükleotidleri seçme yeteneği, replikasyonun doğruluğunu yaklaşık bin kez artırmakta, beklenen hata oranını yaklaşık 10^{-5}'e düşürmektedir.

DNA replikasyonun doğruluğundan sorumlu diğer önemli mekanizma DNA polimerazın **hata düzeltme** (*proofreading*) aktivitesidir. Replikatif DNA polimerazların (ökaryotik polimerazlar δ, ε ve *E. coli* polimeraz III) DNA'yı 3′ den 5′ yönünde hidrolize edebilen ekzonükleaz aktiviteleri vardır. Söz konusu 3′ den 5′ e ekzonükleaz aktivitesi, DNA sentezi ile ters yönde çalışır ve yeni sentezlenen DNA'nın hata düzeltme aktivitesinde yer alır (Şekil 7.11). Hata düzeltme etkilidir, çünkü DNA polimerazın sentezi *de novo* başlatamaz ve primere gereksinim duyar. Tercihen kalıba hidrojen bağı ile bağlı primerler kullanılır, böylelikle yanlış bir baz yerleştiğinde, sentezin devamı için kullanılmaktan ziyade 3′ den 5′ ne ekzonükleaz aktivitesi ile ortadan kaldırılır.



Şekil 7.11 DNA polimeraz ile hata düzeltme (*proofreading*) Kalıp iplikteki T ile hatalı eşleşme sonucunda, A yerine G gelmiştir. Bu hatalı bir eşleşme olduğundan, 3′ ucundaki G kalıp iplikle hidrojen bağı yapamaz. Uzayan zincirin 3′ ucundaki bu hatalı eşleşme, DNA polimerazın 3′den 5′ ne ekzonükleaz aktivitesi ile tanınır ve çıkarılır. Bunun için, kalıp ipliğe hidrojen bağı ile bağlı bir primer gerekmektedir ki, sentez devam edebilsin. Hatalı eşleşmiş G'nin çıkarılmasından sonra, doğru (A) nükleotidin eklenmesiyle sentez devam eder.

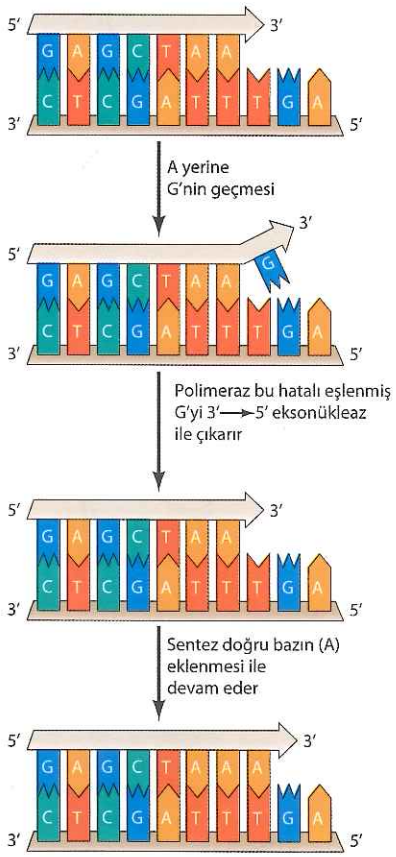
Ökaryotik hücrelerde, DNA replikasyonu esnasında nükleozomlar da yıkılırlar. Atasal kromatinin nükleozomları iki kardeş DNA ipliği arasında paylaşılır ve nükleozomların yeniden yapılanması için gereken histonların eklenmesi, replikasyon çatalı ile birlikte hareket eden ilave proteinler (kromatin yapılanma faktörleri) vasıtasıyla gerçekleşir.

Replikasyonun doğruluğu

DNA replikasyonunun hatasız olması, hücrenin çoğalma süreci açısından önemlidir ve değişik genler için mutasyon oranı hesapları, replikasyon sırasında hata olasılığının, eklenen her 10^9 baz için sadece bir yanlış baz olduğunu göstermiştir. Bu hata frekansı tamamlayıcı baz eşleşmesi temeline bakıldığında, beklenenden çok daha düşüktür. Özellikle, doğru eşleşen ve yanlış eşleşen bazlar arasında farklı hidrojen bağlarının serbest enerji değişimi, doğru baz eşleşmesi oluşumunu yaklaşık yüz kat artıracak destekleyecek kadar büyüktür. Sonuçta baz seçimi basitçe, tamamlayıcı bazlar arasındaki hidrojen bağları tarafından belirlenir. Bunun sonucunda yeni sentezlenen DNA'da hata sıklığı: yaklaşık her 100 nükleotidde bir yanlış bazın eklenmesine karşılık gelir. Daha yüksek oranlarda elde edilen doğruluk, büyük oranda DNA polimerazın aktiviteleri ile sağlanmaktadır.

DNA polimerazın replikasyonun doğruluğunun artırma mekanizmalarından biri, yeni sentezlenen DNA'ya eklenecek doğru bazın seçimine yardım etmektir. DNA polimeraz sadece kalıp ipliğe hidrojen bağıyla herhangi bir nükleotidin eklenmesini katalizlemez. Doğru bir baz eşleşmesi konformasyonuna uyum göstererek, yanlış baz eklenmesini aktif olarak ayırt eder. Örnek olarak, bazı DNA polimerazlarla yakın zamanda yapılan yapısal analizler doğru olarak eşleşmiş dNTP'lerin, DNA polimerazda konformasyonel değişiklikleri uyararak, nükleotidin DNA'ya eklenmesine yol açtığını göstermiştir. DNA polimerazın, eklemek için eşleşmiş nükleotidleri seçme yeteneği, replikasyonun doğruluğunu yaklaşık bin kez artırmakta, beklenen hata oranını yaklaşık 10^{-5}'e düşürmektedir.

DNA replikasyonun doğruluğundan sorumlu diğer önemli mekanizma DNA polimerazın **hata düzeltme** (*proofreading*) aktivitesidir. Replikatif DNA polimerazların (ökaryotik polimerazlar δ, ε ve *E. coli* polimeraz III) DNA'yı 3′ den 5′ yönünde hidrolize edebilen ekzonükleaz aktiviteleri vardır. Söz konusu 3′ den 5′ e ekzonükleaz aktivitesi, DNA sentezi ile ters yönde çalışır ve yeni sentezlenen DNA'nın hata düzeltme aktivitesinde yer alır (**Şekil 7.11**). Hata düzeltme etkilidir, çünkü DNA polimerazın sentezi *de novo* başlatamaz ve primere gereksinim duyar. Tercihen kalıba hidrojen bağı ile bağlı primerler kullanılır, böylelikle yanlış bir baz yerleştiğinde, sentezin devamı için kullanılmaktan ziyade 3′ den 5′ ne ekzonükleaz aktivitesi ile ortadan kaldırılır.



Şekil 7.11 DNA polimeraz ile hata düzeltme (*proofreading*) Kalıp iplikteki T ile hatalı eşleşme sonucunda, A yerine G gelmiştir. Bu hatalı bir eşleşme olduğundan, 3′ ucundaki G kalıp iplikle hidrojen bağı yapamaz. Uzayan zincirin 3′ ucundaki bu hatalı eşleşme, DNA polimerazın 3′den 5′ ne ekzonükleaz aktivitesi ile tanınır ve çıkarılır. Bunun için, kalıp ipliğe hidrojen bağı ile bağlı bir primer gerekmektedir ki, sentez devam edebilsin. Hatalı eşleşmiş G'nin çıkarılmasından sonra, doğru (A) nükleotidin eklenmesiyle sentez devam eder.

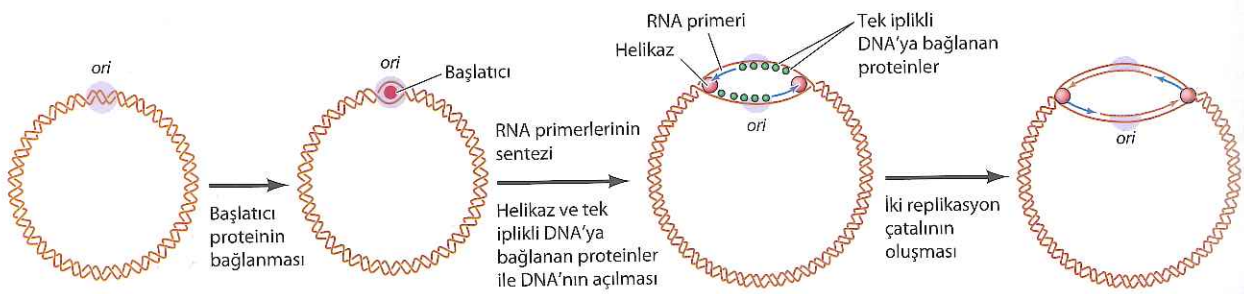
Polimerazların bu 3′den 5′ e ekzonükleaz aktiviteleri, uzayan DNA zincirinin sonuna eklenmiş hatalı bazı seçici olarak uzaklaştırarak, replikasyonun doğruluğunu yüz ile bin kat artırır.

Hatasını düzeltebilme özelliğinin önemi, DNA polimerazların primerlere gereksinmeleri ve DNA ipliğini, yalnızca 5′ den 3′ yönünde katalizlemeleri gerçeğini açıklayabilir. DNA 5′ den 3′ yönünde sentezlendiğinde, polimerleşme için gerekli enerji, uzayan zincirin 3′ hidroksil grubuna eklenen serbest dNTP'nin 5′ trifosfat grubunun hidrolizinden elde edilmektedir (bkz. Şekil 7.1). Eğer DNA 3′ den 5′ yönünde uzuyor olsaydı, polimerleşme enerjisi, DNA'ya halihazırda eklenmiş olan son nükleotidin 5′ trifosfat grubunun hidrolizinden elde edilecekti. Bu durum, hatalı eklenmiş son nükleotidin uzaklaştırılması, zincirin uzaması için gerekli olan 5′ trifosfat grubunun da uzaklaştırılmasına neden olacağından, hatanın düzeltilme olasılığını ortadan kaldıracaktı. Böylelikle, her ne kadar DNA polimerazın, primeri yalnızca 5′ den 3′ yönünde uzatabilmesi replikasyonu karmaşık bir süreç haline getiriyorsa da, genetik materyalin doğru replikasyonunu garantiye almak için gereklidir.

Hatalı eşleşmiş bazların eklenmesini algılayabilme yeteneği birlikte, DNA polimerazların hata düzeltme aktiviteleri, replikasyonun hata sıklığını 10^{7}'den 10^{8} nükleotidde bir hatalı baz olacak şekilde düşürmek için yeterlidir. Yeni sentezlenmiş DNA'ya eklenmiş olan hatalı eşleşmiş bazların uzaklaştırılmasını sağlayan ek mekanizmalar ("DNA onarımı" bölümünde tartışıldı) hata oranını ilaveten 10^{-9}'lara kadar düşürür.

Başlangıç noktaları (orijinler) ve replikasyonun başlaması

Hem prokaryot hem ökaryot DNA'larının replikasyonu **replikasyon orijini** olarak adlandırılan ve replikasyon sürecini başlatan proteinler için özgün bağlanma bölgeleri sunan özel bölgelerden başlar. *E. coli'de* tanımlanmış ilk orijinde yapılan genetik analizler, bakteriyel kromozomda replikasyonun her zaman tek bir bölgeden başladığını göstermiştir. O zamandan beri, *E. coli* orijini detayları ile incelenmiş ve DNA replikasyonunu başlatmak için gerekli proteinlerin bağlandığı, 245 baz çiftlik DNA'dan oluştuğu bulunmuştur (**Şekil 7.12**). En önemli aşama, orijin içerisindeki özgün DNA dizilerine, başlatıcı proteininin bağlanmasıdır. Başlatıcı protein DNA orijinini açmaya



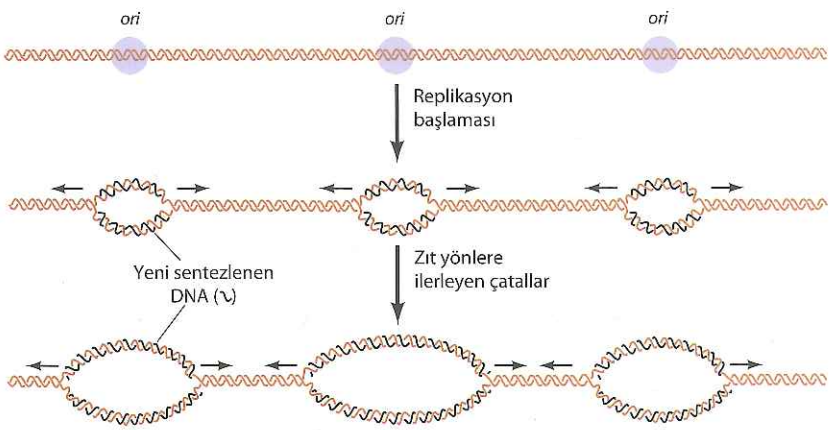
Şekil 7.12 *E. coli*'de replikasyon orijini *E. coli* kromozomunda replikasyon, orijin (*ori*) olarak tanımlanan tek bir bölgeden başlar. İlk olay, kalıbın kısmen açılmasını sağlayan bir başlatıcı proteinin ori DNA'ya bağlanmasıdır. Helikaz ve tek iplikli DNA'ya bağlanan proteinlerin etkisi ile DNA çözülmesi devam eder ve primaz tarafından RNA primerleri sentezlenir. Orijinde oluşan iki replikasyon çatalı çembersel DNA molekülü boyunca zıt yönlere doğru hareket ederler.

başlar ve DNA sentezi için gerekli diğer proteinleri bölgeye çağırır. Helikaz ve tek iplikli DNA'ya bağlanan proteinler, kalıp DNA'yı açmak için çözmeye devam ederler ve primaz öncü ipliğin sentezini başlatırlar. İki replikasyon çatalı oluşur ve çembersel *E. coli* kromozomu boyunca zıt yönlü olarak hareket eder.

SV40 gibi bazı hayvan virüslerinin replikasyon orijinleri, ökaryotlarda DNA sentezinin başlaması için model olarak incelenmiştir. SV40, hem enfekte hücrelerde hem de hücresiz sistemlerde işlevsel olan, tek bir replikasyon orijinine (64 baz çiftinden oluşan) sahiptir. Replikasyon, virüs tarafından kodlanan ve orijine bağlanıp helikaz olarak da görev yapabilen bir protein (T antijen olarak adlandırılır) ile başlatılır. Açılmış kalıbı sabitlemek için, tek iplik DNA'ya bağlanan bir proteine ihtiyaç duyulur ve daha sonra DNA polimeraz α-primaz kompleksi DNA sentezini başlatır.

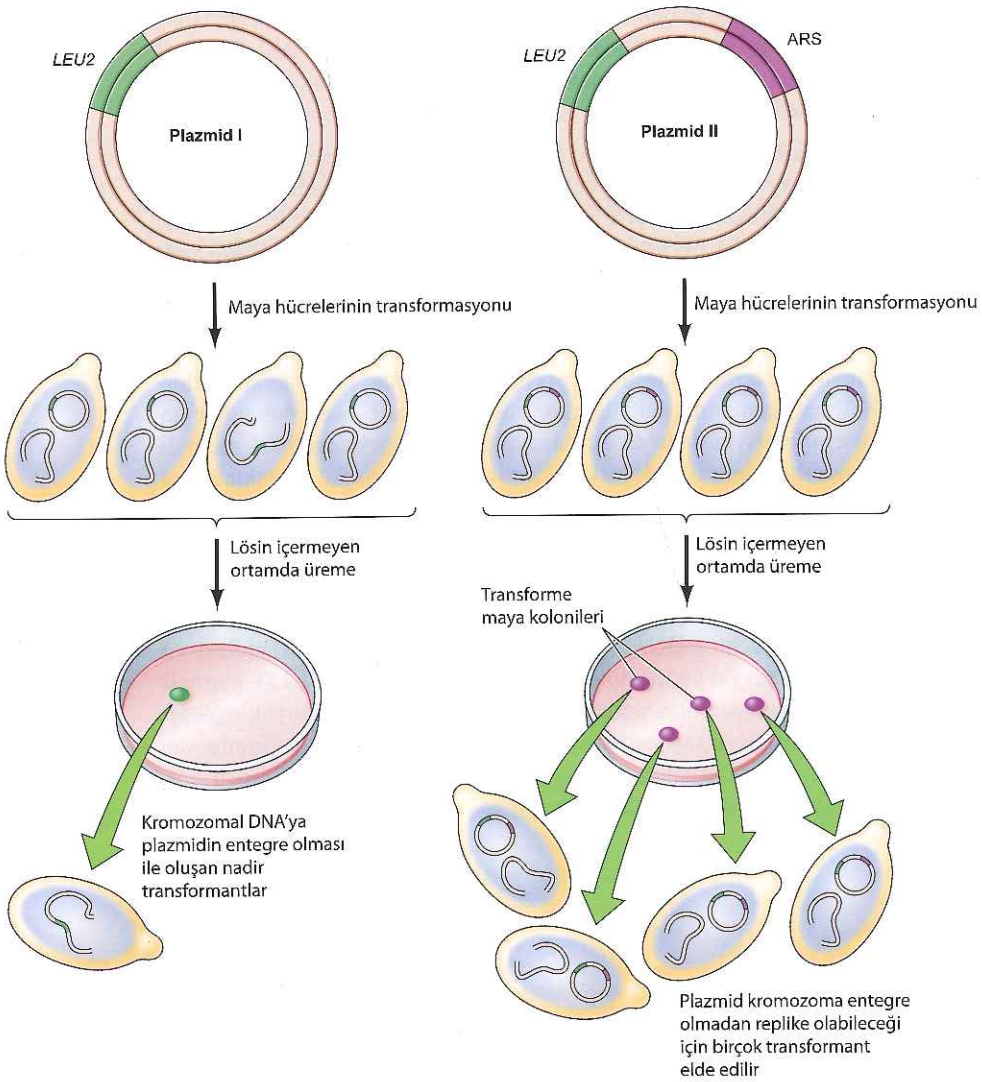
Her ne kadar tek bir orijin, viral ve bakteriyel genomun replikasyonu için yeterli ise de, ökaryotik hücrelerin çok daha büyük genomunun, makul bir zaman içerisinde replikasyonu çok sayıda orijin gerektirmektedir. Örneğin, *E. coli'* nin tüm genomu ($4x10^6$ baz çifti) yaklaşık olarak 30 dakikada, tek bir orijinden başlayarak kopyalanabilir. Eğer memeli genomları ($3x10^9$ baz çifti) aynı hızda ve tek bir replikasyon orijininden replike olsaydı, DNA'nın kopyalanması için yaklaşık 3 hafta (30,000 dakika) gerekli olacaktı. Bu problem, memeli hücrelerinde DNA replikasyonunun hızının, olasılıkla ökaryot DNA'nın kromatine paketlenmesinden dolayı, *E. coli*'dekinden on kez daha yavaş olmasıyla daha da ağırlaşmaktadır. Herşeye rağmen, memeli hücrelerin genomları tipik olarak birkaç saat içerisinde replike olmaktadır ve bu da binlerce replikasyon orijininin kullanılmasını gerektirir.

Ökaryot hücrelerde çok sayıda replikasyon orijininin varlığı ilk kez, değişik zaman aralıklarında radyoaktif timidin ile muamele edilen hücre kültürlerinde, yeni sentezlenen DNA'nın otoradyografi ile görüntülenmesiyle belirlendi. Bu gibi çalışmaların sonuçları, DNA sentezinin bir çok bölgede başladığını ve kromozom boyunca her iki yönde devam ettiğini gösterdi (**Şekil 7.13**). Memeli hücrelerindeki replikasyon orijinlerinin birbirlerinden uzaklıkları yaklaşık 50 ile 300 kb'dır ve bu da insan genomunda 30,000 replikasyon orijininin var olduğu anlamına gelir. Daha basit ökaryotların genomlarında da birden çok orijin bulunur. Örneğin, mayalarda replikasyon, yaklaşık olarak 40 kb aralıklı orijinlerden başlar.



Şekil 7.13 Ökaryot kromozomlarındaki replikasyon orijinleri Replikasyon, her biri iki replikasyon çatalı oluşturan çok sayıda orijinde (*ori*) başlar.

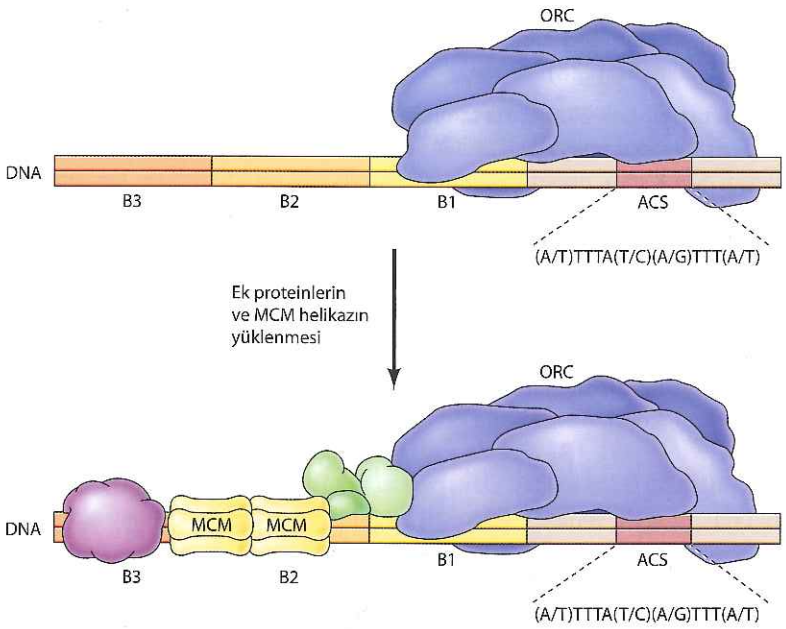
Ökaryot kromozomlarının replikasyon orijinleri ilk olarak *S. cerevisiae*'da çalışılmış ve transforme edilen hücrelerde plazmidlerin replikasyonunu destekleyebilen diziler olarak tanımlanmışlardır (Şekil 7.14). Bu çalışmalar, dizilerin işlevsel analizine olanak sağlamış ve böyle birkaç öge (**bağımsız replike olabilen diziler** veya **ARS** olarak adlandırılan) izole edilmiştir. Replikasyon orijini olarak rolleri, yalnız plazmidlerde değil maya kromozomal DNA'sında da direkt biyokimyasal incelemelerle doğrulanmıştır.



Şekil 7.14 Mayalarda replikasyon orijinlerinin tanımlanması Plazmid I ve II'nin her ikisi de, lösin içermeyen ortamda transforme hücrelerin çoğalmasını sağlayan, seçilebilir bir belirteç (*marker*) gen (*LEU2*) barındırmaktadır. Ancak, sadece plazmid II, bir replikasyon orijini (ARS) içermektedir. Mayaların plazmid I ile transformasyonu, plazmidlerin kromozomal DNA'ya katıldığı, nadir transformantlar üretir. Bununla birlikte, plazmid II maya kromozomuna katılmadan da replike olabildiğinden (bağımsız replikasyon), birçok transformant maya hücresi elde edilebilmektedir.

Fonksiyonel ARS elemanları, farklı ARS'ler için ortak olan 11 baz-çiftlik çekirdek diziyi de kapsayan, 100 baz çifti uzunlukta bölgeyi kaplar (Şekil 7.15). Bu çekirdek dizi, ARS fonksiyonu için esasidir ve *S.cerevisiae* orijinlerinde DNA replikasyonunun başlaması için gerekli olan bir protein kompleksinin (**orijin tanıma kompleksi** veya **ORC**) bağlanma bölgesi olduğu anlaşılmıştır. ORC kompleksinin, diğer proteinleri (MCM DNA helikaz dahil) orijin noktasına çağırarak replikasyon başlamasına öncülük ettiği görülmektedir. *S. cerevisiae*'da DNA replikasyonunun başlama mekanizması, başlatıcı proteinin orijin dizinine özgün bağlanmasıyla, bakterilerle ve ökaryotik virüslerle benzerlik gösterir.

Daha sonraki çalışmalar, ORC proteinlerinin replikasyon başlatıcısı olarak rolünün, mayalardan memelilere kadar tüm ökaryotlarda korunmuş olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, diğer ökaryotlardaki replikasyon orijinleri *S. cerevisiae*'nın ARS elemanlarından çok daha az tanımlanmıştır. Fisyon maya *S. pompe*'de orijin dizinleri, DNA'da 0,5-1 kb kadar bir bölgeyi kaplar. *S. pompe* orijinleri, *S. cerevisiae*'nın ARS elemanlarının iyi tanımlanmış ORC bağlanma bölgelerini içermez. Bunların yerine, *S. pompe*'de ORC kompleksi için bağlanma bölgesi olarak görev yaptığı anlaşılan, A/T-zengin dizi tekrarları bulunur. *Drosophila* ve memeli hücrelerinde ise ORC proteinleri özgün DNA dizilerini tanımıyor gibi görünmektedir. Bunun yerine, yüksek ökaryotlarda ORC bağlanması ve DNA replikasyonunun başlaması kromatin yapısı tarafından belirleniyor olabilir ki, bu husus gelecekteki çalışmalarla aydınlatılmayı beklemektedir.



Şekil 7.15 Bir maya ARS elemanı Orijin fonksiyonuna katkıda bulunan bir *S.cerevisiae* ARS elemanı, 11 baz çiftlik ARS konsensüs dizisi (*ARS consensus sequence-ACS*) ve ilaveten üç elemandan (B1, B2 ve B3) oluşur. Orijin tanıma kompleksi (ORC), ACS ve B1'e bağlanır. ORC sonra, MCM DNA helikazında içinde bulunduğu ilave proteinleri orijine getirir.

Telomerler ve telomeraz: Kromozom uçlarının replikasyonu

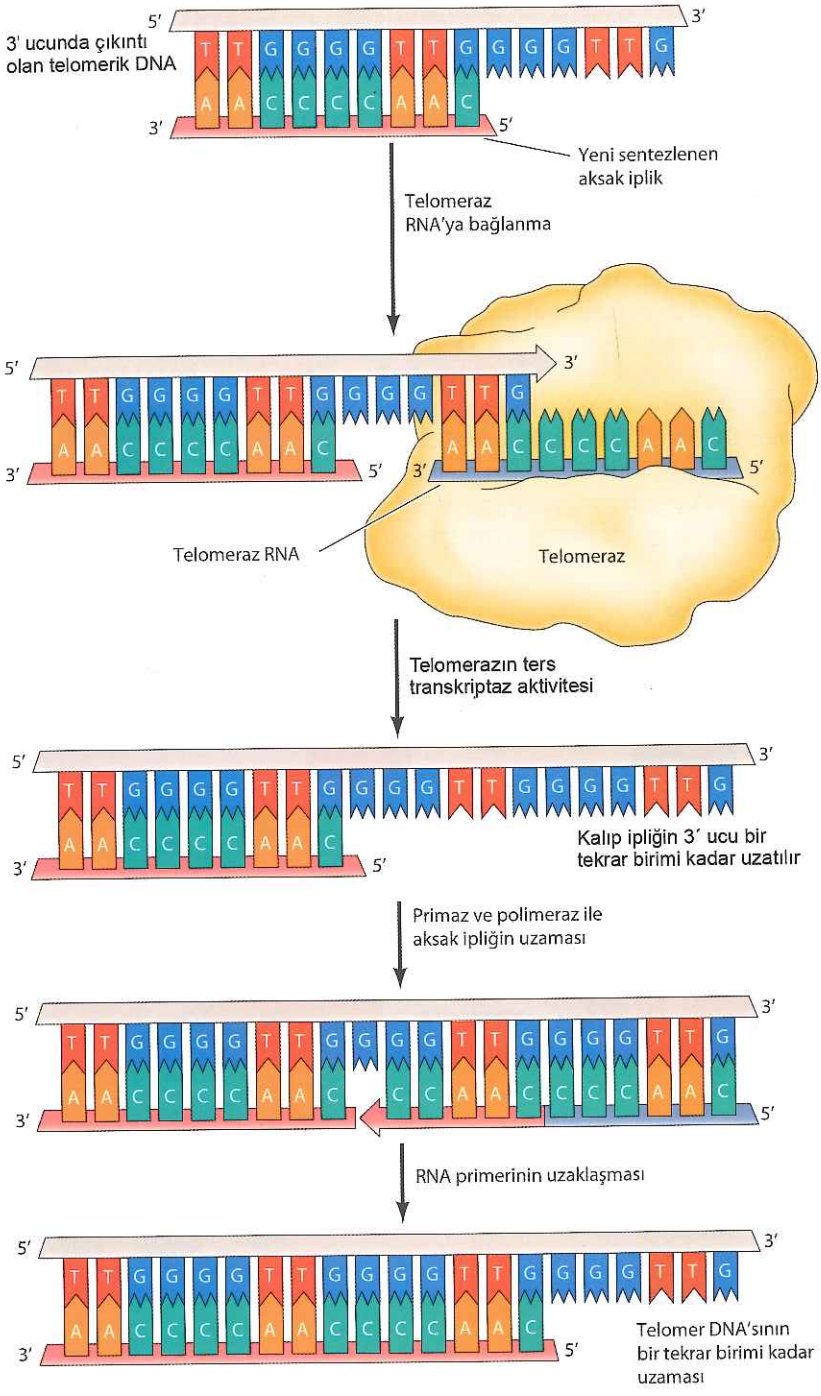
DNA polimerazlar, primerleri sadece 5′den 3′ yönünde uzattıkları için, doğrusal DNA moleküllerinin 5′ uçlarını kopyalayamazlar. Sonuç olarak, ökaryot hücrelerin doğrusal kromozomlarının uç dizilerinin replikasyonu için özel mekanizmalara ihtiyaç vardır. Bu diziler (**telomerler**), basit DNA dizilerinin ardışık tekrarlarını içerirler (bkz. Bölüm 6). Bunlar, sentezlerini DNA kalıbı olmaksızın katalizleyerek telomerleri koruyan, **telomeraz** olarak adlandırılan özgün bir enzim sayesinde replike olurlar.

Telomeraz, ilk olarak retrovirüslerde (bkz. Bölüm 4) keşfedilen ve RNA kalıbından DNA sentezleyen bir DNA polimeraz türü olan, bir **ters transkriptazdır**. Telomerazın, enzim kompleksinin bir parçası olarak, uç tekrar dizilerine tamamlayıcı olan kendi kalıp RNA'sını taşıması önemlidir. Bu RNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla telomeraz, uç tekrar dizilerin çoklu kopyasını oluşturabilmekte ve böylelikle geleneksel şekilde sentezlerini yönlendiren bir DNA kalıbı kullanmadan telomerleri korumaktadır.

Telomeraz etki mekanizması, ilk kez 1985 yılında Carol Greider ve Elizabeth Blackburn'un, protozoa *Tetrahymena* üzerinde yapmış oldukları çalışmalar ile aydınlatılmıştır (**Şekil 7.16**). *Tetrahymena* telomerazı 3′-AACCCCAAC-5′ dizisini barındıran 159 nükleotid uzunluğunda bir RNA ile kompleks yapmıştır. Bu dizi, *Tetrahymena* uç tekrarının (5′-TTGGGG-3′) tamamlayıcısıdır ve telomerik DNA'nın sentezi için kalıp olarak görev yapar. Telomeraz bu RNA'yı kalıp olarak kullanarak, kromozomal DNA'nın 3′ ucunu orijinal uzunluğunun bir birim ötesine uzatır. Daha sonra tamamlayıcı iplik, polimeraz α-primaz kompleksi tarafından, geleneksel RNA primeri kullanılarak sentezlenebilir. RNA primerin uzaklaştırılması ile kromozomal DNA'da kalan çıkıntılı 3′ ucu, ökaryotik kromozomlarının uçlarında ilmekler oluşturur (bkz. Şekil 6.28).

Telomeraz bir çok ökaryotda tanımlanmış ve telomeraz RNA'sını kodlayan genler *Tetrahymena,* mayalar, fareler ve insanlarda klonlanmıştır. Her birinde, telomeraz RNA'sı o organizmanın telomerik tekrar dizilerine tamamlayıcı diziler barındırmaktadır (bkz. Tablo 6.6). Hatta mayalara, mutant telomeraz RNA genleri eklendiğinde, kromozomal telomerik tekrar dizilerinde bu değişim ile uyumlu sonuçlar alınmıştır. Bu da, ökaryot kromozomlarının uçlarının korunmasında telomerazların etkisinin direkt göstergesidir.

Telomeraz ve telomerlerin normal olarak devamlılığı ile ilgili kusurlar bir çok insan hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Bölünen hücrelerde telomerlerin normal uzunluklarının korunması telomeraz aktivitesi ile düzenlenir. Örneğin insan hücrelerinde telomerler 3′ ucunda tek-iplikli 150-200 bazlık bir çıkıntı içeren, yaklaşık olarak 10 kb'lik bir alanı kaplarlar. Bu uzunluk germ hücrelerinde korunurken, birçok somatik hücrede telomer uzunluklarının sınırsız sayıda bölünme için sürekliliğini sağlayan yeterli telomeraz aktivitesi yoktur. Bu nedenle, hücre yaşlandıkça telomerler kademeli olarak kısalır ve sonunda bu kısalma hücre ölümü ya da senesens ile sonuçlanır. İlginç olarak, birkaç erken yaşlanma sendromu telomer kaybının normalden fazla olamasıyla karakterizedir ve bu hastalıkların bazılarının direk olarak telomerazdaki mutasyonlardan kaynaklandığı bulunmuştur. Diğer taraftan, kanser hücreleri telomerazı oldukça fazla düzeyde eksprese ederek, sınırsız bölünmelerine olanak sağlarlar. Bazı insan deri kanserlerinde (melanoma), düzenleyici dizilerde telomeraz

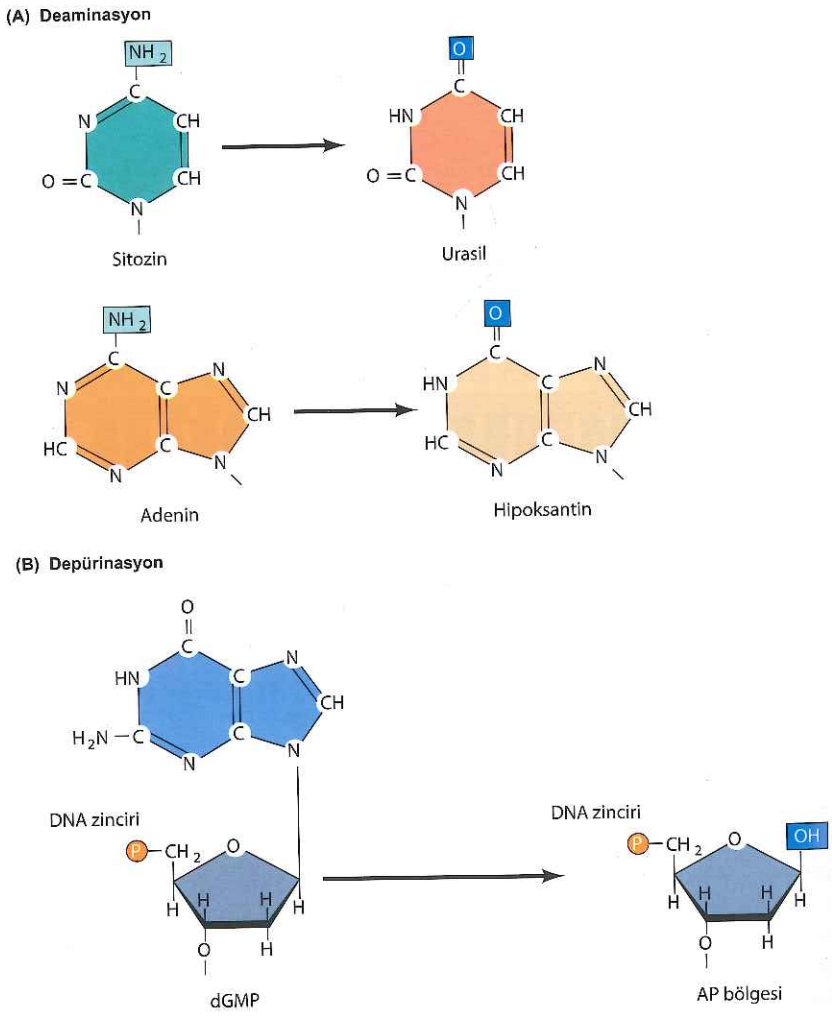


Şekil 7.16 Telomerazın çalışması Telomerik DNA 3′ ucunda bir çıkıntı olan basit tekrar dizileridir. Telomeraz, telomerik DNA'ya komplementer olan kendi RNA molekülünü, enzim kompleksinin bir parçası olarak taşır. Telomerik DNA'nın çıkıntılı ucu telomeraz RNA'ya bağlanarak, kalıp DNA'nın bir tekrar birimi uzaması için kalıp görevini görür. Daha sonra aksak ipliğin telomerik DNA'sı, geleneksel RNA primerleri kullanılarak ve DNA polimeraz aktivitesi ile uzatılır.

aktivitesindeki artış ile sonuçlanan mutasyonların, artan telomeraz seviyesinin kanser gelişimine doğrudan katkı sağlayabileceğini desteklemektedir.

DNA Tamiri

DNA, herhangi bir diğer molekül gibi, çeşitli kimyasal tepkimelere uğrayabilir. Ancak DNA benzersiz bir biçimde hücre genomunun kalıcı tek kopyasını oluşturması nedeniyle, DNA'nın yapısındaki değişiklikler, hücrenin RNA'lar ve proteinler gibi diğer bileşenlerindeki değişimlerinden çok daha önemli sonuçlar doğurur. Mutasyonlar, DNA replikasyonu sürecinde yanlış bazların eklenmesinden kaynaklanabilir. Ayrıca, DNA'da çeşitli kimyasal değişimler ya kendiliğinden (Şekil 7.17), ya da radyasyona veya kimyasallara maruz kalmanın bir sonucu olarak (Şekil 7.18) ortaya çıkar. DNA'daki bu gibi hasarlar transkripsiyon ya da replikasyonu durdurabilir ve mutasyon sıklığının artması ile sonuçlanabilir. Bunlar, hücre çoğalması açısından kabul edilemez sonuçlardır. Hücreler, genomlarının bütünlüğünü korumak için, hasarlı DNA'yı onaran mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu DNA onarım mekanizmaları iki ana gruba ayrılabilir: (1) DNA hasarını oluşturan kimyasal reaksiyonun

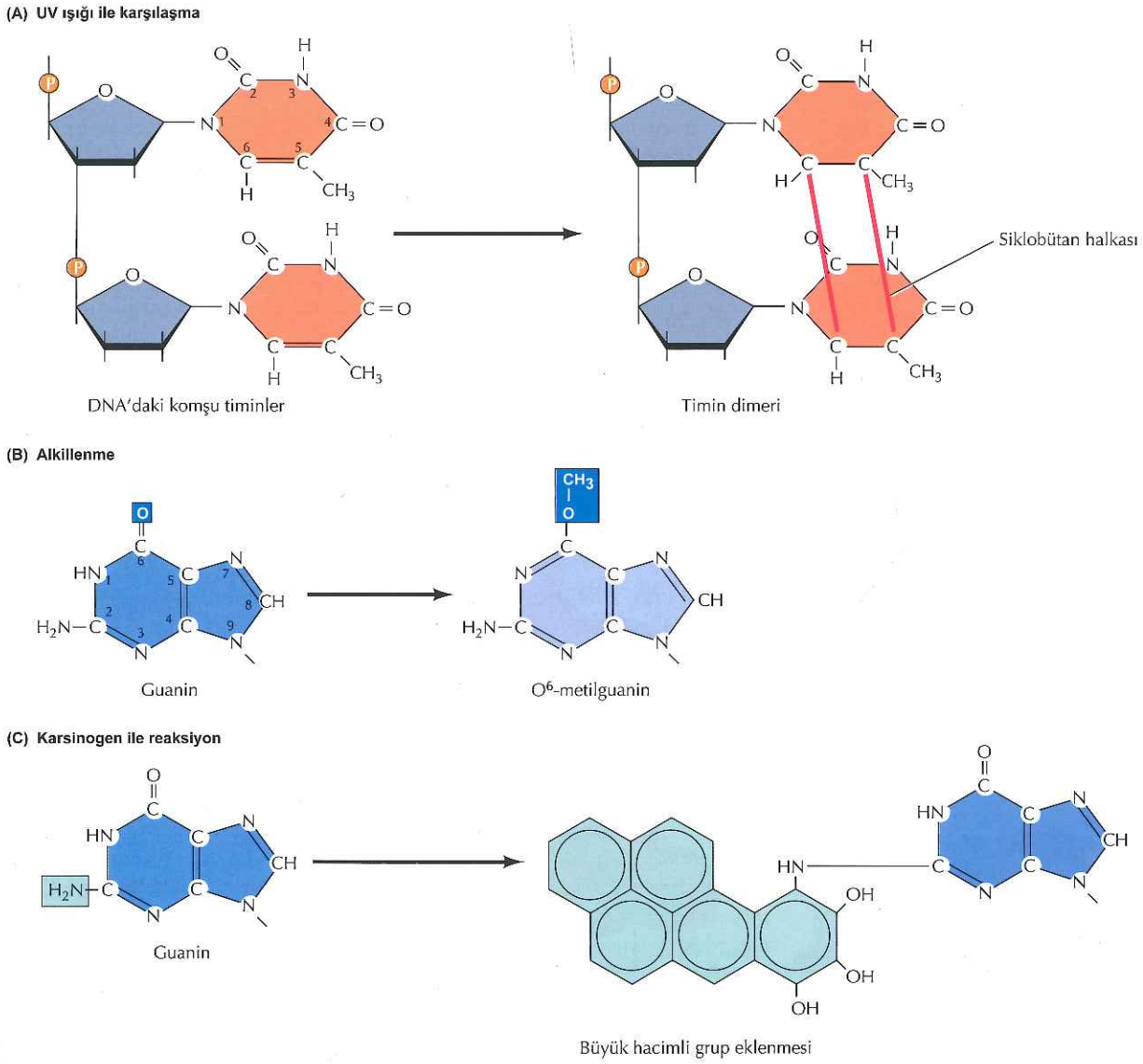


Şekil 7.17 DNA'da kendiliğinden oluşan hasar DNA'da kendiliğinden oluşan hasarın iki temel formu vardır: (A) Adenin ve sitozinin deaminasyonu (amino gruplarının kaybı) ve (B) pürin bazları ve deoksiriboz ların arasındaki bağı koparak DNA'da apürinik (AP) bölgenin oluşmasına neden olan depürinasyon (pürin bazlarının kaybı). dGMP=deoksiguanozin monofosfat.

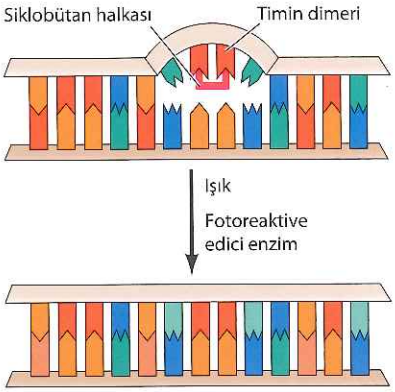
doğrudan tersine çevrilmesi ve (2) hasarlı bazların yeni sentezlenen DNA ile değiştirilmesi. DNA tamirinin çalışmadığı noktalarda ise, hücrelerin hasarla başa çıkabilmesi için ek mekanizmalar gelişmiştir.

DNA hasarının doğrudan geri döndürülmesi

DNA'da oluşan birçok hasar, hasarlı bazların uzaklaştırılmasının ardından, çıkarılan bölgenin yeniden sentezlenmesi ile onarılır. Bununla birlikte, DNA'da bazı lezyonlar, hasarın doğrudan geri döndürülmesi ile onarılabilir



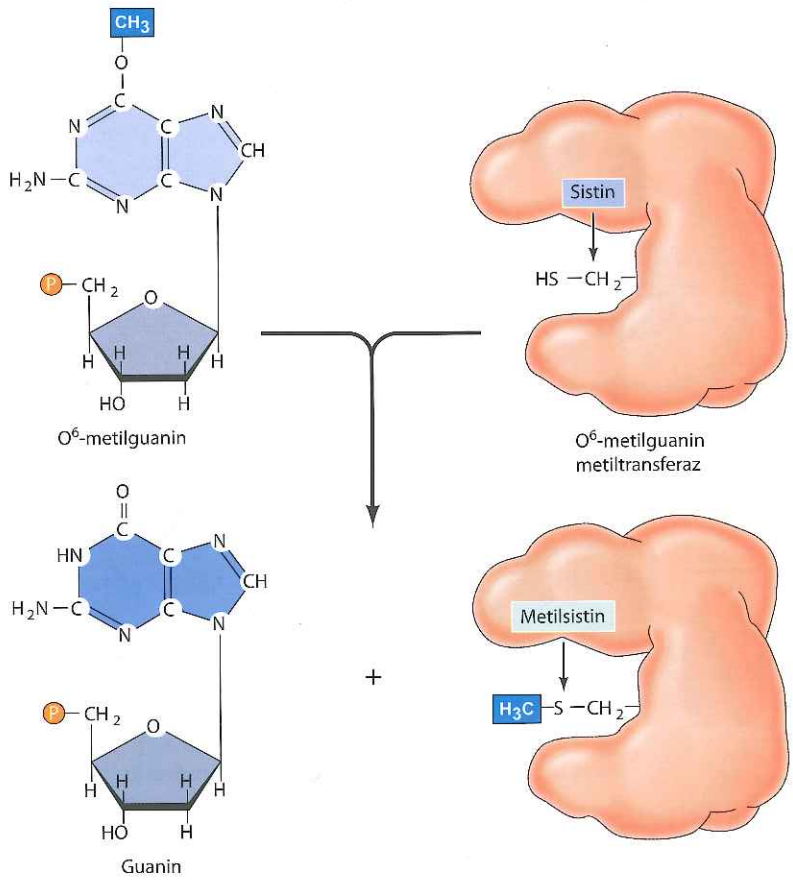
Şekil 7.18 Radyasyon ve kimyasallarla uyarılan DNA hasarı örnekleri (A) UV ışığı, iki komşu pirimidinin (örn., timinler) bir siklobütan halka yapısı ile birleştiği, pirimidin dimerinin oluşumunu uyarır. (B) Alkillenme, DNA bazlarına değişik pozisyonlarda metil veya etil gruplarının eklenmesidir. Bu örnekte guaninin O^6 pozisyonundan alkillenmesi ile O^6-metilguanin oluşur. (C) Bir çok karsinojen (örn., benzo[α] piren) DNA bazları ile reaksiyona girerek, DNA molekülüne büyük hacimli kimyasal gruplar eklenmesine neden olur.



Şekil 7.19 Timin dimerlerinin fotoreaktivasyon ile doğrudan onarımı UV ile uyarılan pirimidin dimerleri, görünür ışık enerjisinin siklobütan halkasını oluşturan bağların açılması için kullanıldığı, fotoreaktivasyon ile onarılabilir.

ki bu, sık görülen özgün tipteki DNA hasarları ile başetmek için etkin bir yol olabilir. Sadece bir kaç tip DNA hasarı, özellikle, morötesi (UV) ışığa maruz kalınmasıyla oluşan pirimidin dimerleri ve pürin halkasına O^6 pozisyonundan metil veya etil gruplarının eklenmesiyle değişime uğramış alkillenmiş guaninler bu yolla onarılır.

UV ışını, DNA hasarının oluşumundaki ana kaynaklardan birisidir ve onarım mekanizmaları bağlamında en detaylı araştırılmış olan DNA hasar şeklidir. Güneş ışığındaki UV'ye maruz kalmanın insanlarda hemen hemen tüm deri kanserlerinin nedeni olması, bunun öneminin bir göstergesidir. UV ışını ile uyarılan başlıca DNA hasarı, aynı DNA ipliği üzerindeki komşu iki pirimidinin 5 ve 6 ncı karbonları arasındaki çift bağın doyurulması sonucunda, iki pirimidinin siklobütan halkasıyla birleşmesi ile oluşan **pirimidin dimerleridir** (bkz. Şekil 7.18A). Bu dimerlerin oluşumu, DNA zincirinin yapısında biçim bozukluklarına neden olur ve hasarlı bölgeyi geçerken replikasyon ve transkripsiyonu durdurur. Bu nedenle onarılmaları, hücrenin UV ışınına karşı hayatta kalma becerisiyle yakından ilişkilidir. UV ile uyarılan pirimidin dimerlerinin tamir mekanizmalarından biri, dimerizasyon reaksiyonunun direkt olarak geri dönüştürülmesidir. Siklobütan halka yapısının kırılması için gerekli olan enerji görünür ışıktan sağlandığı için, bu süreç **fotoreaktivasyon** olarak adlandırılır (Şekil 7.19). Bu durumda DNA'daki pirimidin bazları, normal durumlarına dönüştürülmüş olur. Güneş'ten gelen UV ışınının farklı hücrelerde başlıca DNA hasarı nedeni olmasından bekleneceği gibi, pirimidin dimerlerinin fotoreaktivasyon ile tamiri, *E. coli,* maya, bazı bitki ve hayvan türleri gibi, çeşitli prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde ortaktır. Bununla birlikte, fotoreaktivasyon genellenemez, plasentalı memeliler tür (insan dahil) bu DNA onarım mekanizmasına sahip değildir.



Şekil 7.20 O^6-metilguaninin onarımı O^6-metilguanin metiltransferaz, metil grubunu O^6-metil guaninden çıkartarak, enzimin aktif merkezinde yer alan bir sistin kalıntısına aktarır.

Diğer bir doğrudan onarım şekli, alkilleyici ajanlarla DNA arasındaki reaksiyon sonucunda oluşan hasarlar üzerinde etkilidir. Alkilleyici ajanlar, DNA bazlarına metil veya etil gruplarını aktararak DNA bazını kimyasal olarak değiştiren reaktif bileşiklerdir (bkz. Şekil 7.18B). Guaninin O^6 pozisyonundan metillenmesi O^6-metilguanin, sitozin yerine timin ile baz çifti oluşturduğundan özellikle önemli bir hasardır. Bu hasar, O^6-metilguanindeki metil grubunu, kendi aktif merkezinde bulunan bir sistine aktaran bir enzim (O^6-metilguanin metiltransferaz olarak adlandırılır) ile onarılabilir (Şekil 7.20). Böylelikle, potansiyel mutajenik kimyasal değişim

uzaklaştırılır ve orijinal guanin onarılmış olur. Bu doğrudan onarım reaksiyonunu katalizleyen enzimler, insanlar dahil ökaryot ve prokaryotlarda yaygındır.

Kesip çıkarma (eksizyon) tamiri

Her ne kadar doğrudan onarım özel tip DNA hasarlarının tamirinde etkin bir yol ise de, kesip çıkararak tamir DNA'daki birçok kimyasal değişimin onarımı için daha genel bir mekanizmadır. Sonuç olarak, kesip-çıkararak tamirin değişik tipleri hem prokaryotik hem de ökaryotik hücreler için en önemli DNA onarım mekanizmasıdır. Kesip çıkararak tamirde hasarlı DNA tanınır ve serbest baz ya da nükleotidler halinde çıkarılır. Oluşan boşluk, hasar almamış tamamlayıcı iplik kalıp olarak kullanılarak sentezlenen, yeni bir DNA ipliği ile doldurulur. Üç çeşit kesip çıkararak onarım tipi-baz çıkarma, nükleotid çıkarma ve hatalı eşleşme onarımı-hücrelerin değişik tipteki DNA hasarlarının üstesinden gelebilmelerini sağlar.

BAZ-KESİP ÇIKARMA TAMİRİ Urasil içeren DNA'nın onarımı, hasarlı tek bazların tanınarak DNA molekülünden uzaklaştırıldığı **baz-kesip çıkarma tamiri** için iyi bir örnektir (Şekil 7.21). DNA'da urasil iki mekanizma ile ortaya çıkar: (1) Urasil (dUTP [deoksiüridin trifosfat] olarak) DNA sentezi sırasında nadiren timinin yerine katılabilir ve (2) urasil DNA'da sitozinin deaminasyonu ile oluşabilir (bkz. Şekil 7.17A). İkinci mekanizma, tamamlayıcı baz eşleşme düzenini değiştirmesi ve böylece mutajenik bir etki göstermesi nedeniyle, biyolojik olarak çok daha büyük önem taşır. DNA'daki urasil, DNA omurgasındaki deoksiriboz ile baz (urasil) arasındaki bağı koparan **DNA glikozilaz** tarafından çıkarılır. Bu reaksiyonun ürünleri, serbest urasil ve apirimidinik-baz taşımayan şeker-bölgesidir. DNA glikozilaz ayrıca, adeninin deaminasyonu ile oluşan hipoksantin, pirimidin dimerleri, O^6 alkilguanin dışındaki alkillenmiş pürinleri ve oksidasyon veya iyonize radyasyon ile hasar almış bazlar gibi, diğer normal olmayan bazları da tanır ve uzaklaştırır.

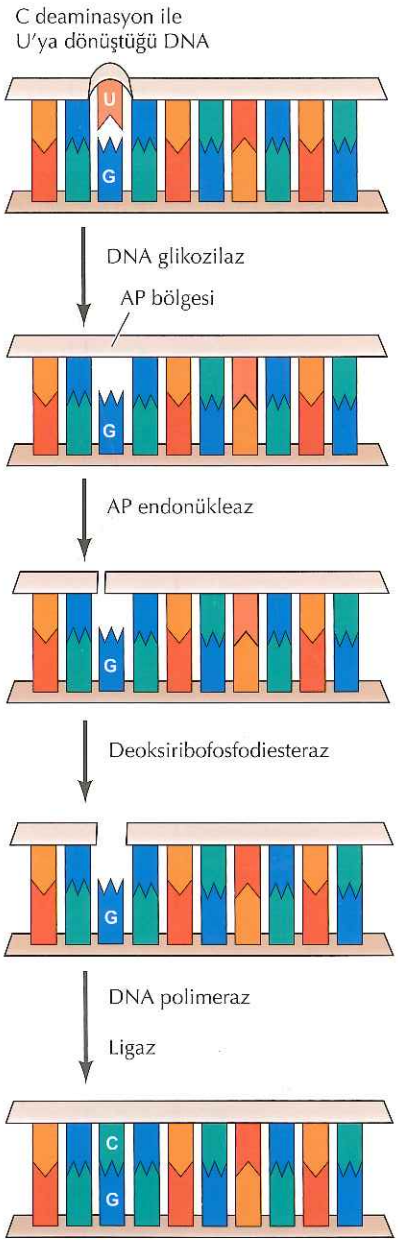
DNA glikozilaz etkinliğinin sonucu, DNA'da apirimidinik veya apürinik (genellikle AP bölgesi olarak adlandırılır) bir bölgenin oluşmasıdır. Benzer AP bölgeleri, normal hücresel koşullarda önemli oranlarda meydana gelen, spontan pürin bazı kaybı sonucunda da ortaya çıkar (bkz. Şekil 7.17B). Örneğin, insan vücudundaki her hücrenin, her gün birkaç bin pürin bazını kaybettiği tahmin edilmektedir. Bu bölgeler, komşu AP bölgesini kesen **AP endonükleaz** tarafından onarılır (bkz. Şekil 7.21). Geride kalan deoksiriboz kısmı uzaklaştırılır ve oluşan tek bazlık boşluk DNA polimeraz ve ligaz tarafından doldurulur.

NÜKLEOTİD-KESİP ÇIKARMA TAMİRİ DNA glikozilazlar sadece spesifik hasarlı baz tiplerini tanıdığı halde, diğer kesip-çıkarma onarım sistemleri DNA molekülünün biçimini bozan, UV ile uyarılmış pirimidin dimerleri ve bir çok karsinojenin DNA ile etkileşimi sonucu DNA bazlarına

Şekil 7.21 Baz kesip-çıkarma tamiri Bu örnekte sitozinin (C) deaminasyonu ile urasil (U) oluşmuştur ve bu nedenle DNA'nın tamamlayıcı ipliğinde guaninin (G) karşısındadır. Urasil ve deoksiriboz arasındaki bağ DNA glikozilaz ile, DNA'da bazsız bir deoksiriboz (AP bölgesi) bırakarak kesilir. Bu nokta, DNA zincirini kesen AP endonükleaz tarafından tanınır. Kalan deoksiriboz, deoksribofosfodiesteraz ile uzaklaştırılır. Oluşan boşluk daha sonra DNA polimeraz tarafından doldurulur ve ligaz ile bağlantı tamamlanır, böylece G'nin karşısına doğru bazın (C) girmesi sağlanır.

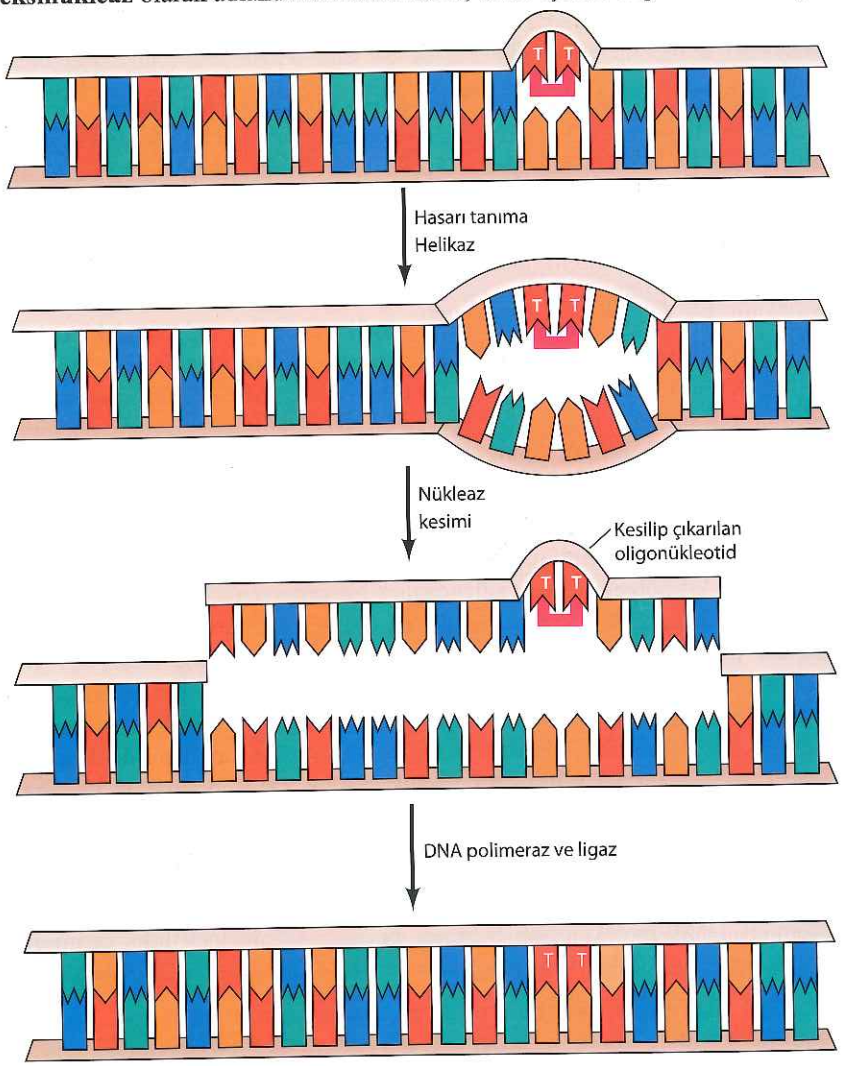
Bilgi İçin

DNA tamir şampiyonu: *Deinococcus radiodurans* bakterisi radyasyonla sterilize edildiği düşünülen et konservesinden 1956 yılında izole edilmiştir. Bakteri radyasyona karşı gösterdiği yüksek seviyedeki dirençten ötürü sağ kalmıştır. *D. radiodurans*iyonize radyasyona karşı *E. coli*'ye göre 100 kattan daha fazla dirençlidir.



eklenen büyük hacimli gruplar gibi, çok geniş çeşitlilikteki hasarları tanırlar (bkz. Şekil 7.18C). Hasarlı bazların (örn., timin dimerleri), lezyonu içeren oligonükleotidle birlikte uzaklaştırılması nedeniyle, bu yaygın DNA onarım formu, **nükleotid-kesip çıkarma tamiri** olarak bilinir (Şekil 7.22).

E. coli'de nükleotid kesip-çıkarma tamiri, bu gen bölgesindeki mutasyonların UV ışığına aşırı duyarlılığına neden olması sonucunda tanımlanan üç genin (*uvrA*, *uvrB* ve *uvrC*) ürünleri tarafından katalizlenir. UvrA proteini hasarlı DNA'yı tanır ve UvrB ile UvrC'yi bu bozuk bölgeye sürükler. Daha sonra, UvrB ve UvrC hasarlı bölgeyi sırasıyla, 3′ ve 5′ taraflarından keserek, 12 ile 13 bazlık bir oligonükleotid dizisini çıkarırlar. UvrABC kompleksi, direk olarak bir oligonükleotidi doğrudan kesip- çıkarabilme özelliğinden dolayı, genellikle **eksinükleaz** olarak adlandırılır. Daha sonra, hasar içeren oligonükleotidin çift

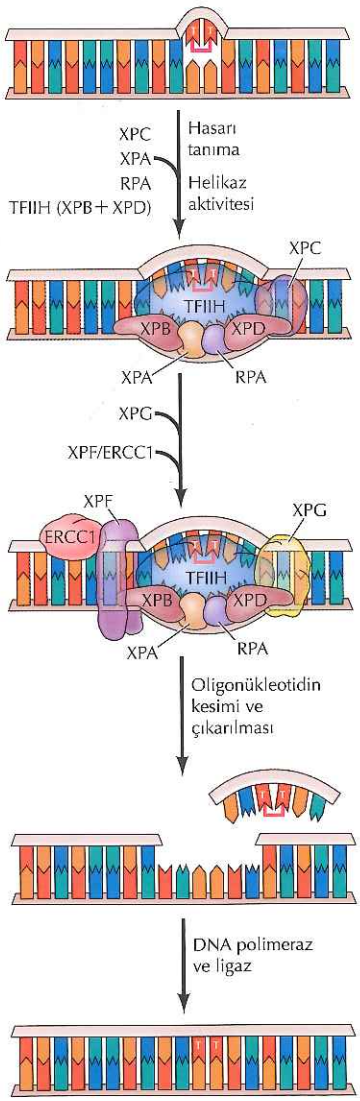


Şekil 7.22 Timin dimerlerinin nükleotid kesip-çıkarma ile tamiri Hasar görmüş DNA'nın tanıması ve sonrasında hasarın etrafındaki DNA'nın açılması bir helikaz tarafından gerçekleşir. Daha sonra DNA, timin dimerin her iki tarafından da 3′ ve 5′ nükleazlar ile kesilir. Bunun sonucunda hasarlı bazları içeren oligonükleotid kesilip-çıkarılır. Daha sonra oluşan boşluk DNA polimeraz ile doldurulur ve ligaz ile yapıştırılır.

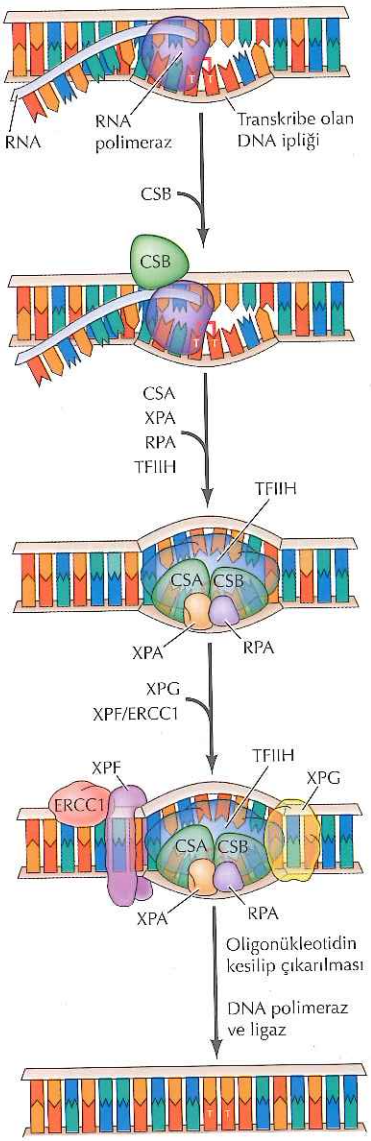
iplikli DNA molekülünden uzaklaştırılması için helikaz aktivitesi gerekir ve oluşan boşluk DNA polimeraz I ile doldurulur, ligaz ile uçlar bağlanır.

Nükleotid–çıkarma onarım sistemi, maya, kemirgen ve insanları da kapsayan ökaryotlarda kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Mayalarda, *E. coli*'de olduğu gibi, DNA onarımıyla ilişkili birkaç gen *(radyasyon* duyarlılığı nedeniyle *RAD* genleri olarak adlandırılır), UV ışığına aşırı duyarlı mutantların izolasyonu sayesinde tanımlandı. İnsanda DNA tamir genleri, genellikle DNA hasarı onarımındaki bozukluklar sonucunda ortaya çıkan kalıtımsal hastalıklara yakalanan bireylerde yapılan çalışmalarla tanımlanmıştır. Bu hastalıklardan en çok çalışılanı, 250.000 kişiden birini etkileyen nadir bir genetik hastalık olan *xeroderma pigmentosum* (XP)'dur. Bu hastalığı taşıyan bireyler, UV ışığına aşırı duyarlıdırlar ve güneş gören vücut bölgelerinde yaygın deri kanserleri gelişir. James Cleaver 1968'de, XP hastalarının kültürdeki hücrelerinin nükleotid kesip-çıkarma tamiri yeteneğinden yoksun olduklarını gösteren önemli bir buluş yaptı. Bu gözlem yalnızca DNA onarımı ile kanser arasındaki bağı gösteren ilk gözlem olmakla kalmayıp, aynı zamanda insan DNA onarım genlerinin tanımlanması için XP hücrelerin deneysel sistem olarak öne çıkardı. İnsan DNA onarım genlerinin tanımlanması sadece XP hücreleriyle yapılan çalışmalarla değil, aynı zamanda, DNA tamiri bozukluklarından kaynaklanan iki farklı insan hastalığı (*Cockayne sendromu* ve *trikodistrofi*) ve kemirgen hücre hatlarının UV-duyarlı mutantlarından elde edilen verilerle gerçekleştirilmiştir. DNA tamiri bozuk memeli hücrelerinin varlığı, gen transferi testlerinde doğal tipteki allellerin mutant hücreleri normal UV duyarlılık düzeyine, geri dönüştürme yeteneği temel alınarak, tamir genlerinin klonlanmasını olası kılmıştır. Böylece, memelilerde nükleotid kesip-çıkarma tamirinin deneysel analizinde yeni kapılar açmıştır.

Moleküler klonlama ile yedi farklı tamir geninin (XPA'dan XPG'ye kadar simgelenmiştir) xeroderma pigmentosum'un yanında Cockayne sendromu, trikotiyodistrofi ve kemirici hücre hatlarının UV-duyarlı kemirgen hücre mutantlarında da mutasyona uğradığı gösterilmiştir. Bu memeli DNA tamir genleri tarafından kodlanan proteinlerin, maya *RAD* genlerinden kodlanan proteinler ile yakın benzerlik göstermesi, nükleotid kesip-çıkarma tamirinin ökaryotlarda korunmuş olduğunu gösterir. Klonlanmış maya ve memeli tamir genlerinin mevcudiyeti ile, bunların kodladıkları proteinlerin saflaştırılması ve tamir ürecindeki rollerini araştırmak üzere *in vitro* sistemlerin geliştirilmesi mümkün olmuştur (**Şekil 7.23**). Memeli hücrelerinde kesip çıkarma tamirinin başlangıç basamağı, bozulmuş baz eşleşmesinin XPC tarafından tanınmasıdır. Bu süreci, bu bölümde daha önceden bahsedildiği gibi, XPA'nın, tek iplikli DNA'ya bağlanan protein olan, replikasyon proteini A'nın (RPA) (bkz. Şekil 7.8) ve ökaryotik genlerin transkripsiyonunu başlatmak için gerekli olan ve TFIIH olarak adlandırılan birçok üniteli transkripsiyon faktörünün işbirliği içinde bağlanması takip eder (bkz. Bölüm 8). Bazı durumlarda XPE'de hasarın tanınmasında rol alabilir. TFIIH'ın iki alt birimi XPB ve XPD proteinleri



Şekil 7.23 Memeli hücrelerinde nükleotid kesip-çıkartma onarımı DNA hasarının (örn.,timin dimeri) XPC tarafından tanınmasını, XPA ve RPA ile birlikte XPB ve XPG helikazları içeren TFIIH'ın bağlanması takip eder. DNA'nın XPB ve XPD ile açılmasının ardından, XPG ve XPF/ERCC1 endonükleazlar getirilirerek DNA kesilir ve hasarlı oligonükleotid çıkartılır. Oluşan boşluk DNA polimeraz tarafından doldurulur ve DNA ligaz ile yapıştırılır.



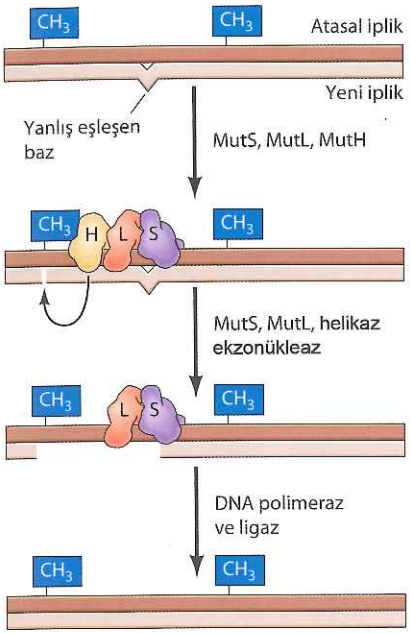
Şekil 7.24 Memeli hücrelerinde transkripsiyon eşlikli onarım DNA'nın transkribe olan ipliğinde DNA hasarı (örn., Bir timin dimeri) varlığında RNA polimeraz durdurulur. Durdurulan polimeraz hasarın olduğu bölgedeki CSB tarafından tanınır. Daha sonra CSB tarafından CSA, XPA, RPA ve TFIIH getirilir ve kesip-çıkarma tamiri Şekil 7.23'te anlatıldığı gibi gerçekleşir.

helikaz gibi davranarak hasarın civarındaki DNA'daki 25 baz çiftini çözer. Sonrasında, ERCC1 (UV hassas kemirgen hücrelerinde tanımlanmış bir tamir proteini) ile heterodimer olan XPF proteini tarafından XPG proteini komplekse getirilir. XPF/ERCC1 ve XPG DNA'nın hasarlı kısmını sırasıyla 5′ ve 3′ uçlarından kesen endonükleazlardır. Bu kesim 30 baz içeren bir oligonükleotidi kesip çıkarır. Ortaya çıkan boşluk daha sonra DNA polimeraz δ tarafından doldurulur ve ligaz tarafından birleştirilir.

TRANSKRİPSİYON-EŞLİKLİ ONARIM Her ne kadar, genom boyunca hasara uğramış DNA tanınıyor olsa da, nükleotid kesip-çıkarma tamirinin alternatif formu olan ve **transkripsiyon-eşlikli onarım** olarak adlandırılan mekanizma, özellikle aktif olarak transkribe olan genlerdeki hasarın tamirine hizmet etmektedir (**Şekil 7.24**). Transkripsiyon ve tamir arasındaki bağlantı ilk kez hem *E. coli* ve hem de memeli hücrelerinde DNA'nın transkribe olan ipliğinin, transkribe olmayan ipliğe kıyasla daha hızlı olduğunu gösteren deneylerle önerildi. DNA hasarı transkripsiyonu blokladığından, transkripsiyon-tamir eşleşmesinin, aktif olarak eksprese edilen genlerdeki hasarın tamir edilmesine öncelik tanımasını sağlayarak hücrelere avantaj sağladığı düşünülmüştür. *E. coli* ve memeli hücrelerinin her ikisinde de, transkripsiyon-tamir eşleşmesinin mekanizması, transkribe olan DNA'daki lezyonda duraklayan RNA polimerazın tanınmasını gerektirir. *E. coli*'de duraklamış RNA polimeraz transkripsiyon-tamir eşleştirme faktörü adı verilen protein tarafından tanınır. Bu protein RNA polimerazı kaldırıp yerine UvrABC eksinükleazı getirir. Memeli hücrelerinde transkripsiyon eşlikli onarım *Cockayne* sendromu hastalığından sorumlu gen tarafından kodlanan ve CSB olarak adlandırılan proteinin, duraklamış RNA polimerazı tanımasını içerir. Xeroderma pigmentosum hastalarından farklı olarak, Cockayne sendromlu hastaların özellikle transkripsiyon-eşlikli onarımda kusurlu olması, CSB'nin transkripsiyon-tamir eşleştirme faktörü rolü ile örtüşmektedir. Duraklamış RNA polimerazı tanıdıktan sonra, CSB Cockayne sendromuna neden olan başka bir protein olan CSA'nın yanı sıra XPA, RPA ve TFIIH'ı da DNA hasar bölgesine getirir ve nükleotid kesip-çıkarma tamiri Şekil 7.23'de gösterildiği gibi ilerler.

HATALI EŞLEŞME TAMİRİ DNA replikasyonu esnasında ortaya çıkan hatalı eşleşmiş bazları farklı bir kesip-çıkarma tamir sistemi tanır. Birçok bu gibi hatalı eşleşmiş baz, DNA polimerazın hata düzeltme aktivitesi ile uzaklaştırılır. Gözden kaçanlar daha sonra, yeni sentezlenmiş DNA'yı tarayan **hatalı eşleşme tamir** sistemi ile onarılır. Bir hatalı eşleşme bulunduğunda, bu sistemdeki enzimler, spesifik olarak yeni replike olmuş DNA ipliğindeki hatalı bazı bulup çıkarır ve hatanın düzeltilmesi ile orijinal dizinin korunmasını sağlarlar.

E. coli'de hatalı eşleşme tamiri sisteminin, atasal DNA ipliği ile yeni sentezlenen DNA ipliğini birbirinden ayırt edebilmedeki yetkinliği, bu bakterinin DNA'sındaki, GATC dizilerinde yer alan adeninlerin, 6-metiladenin

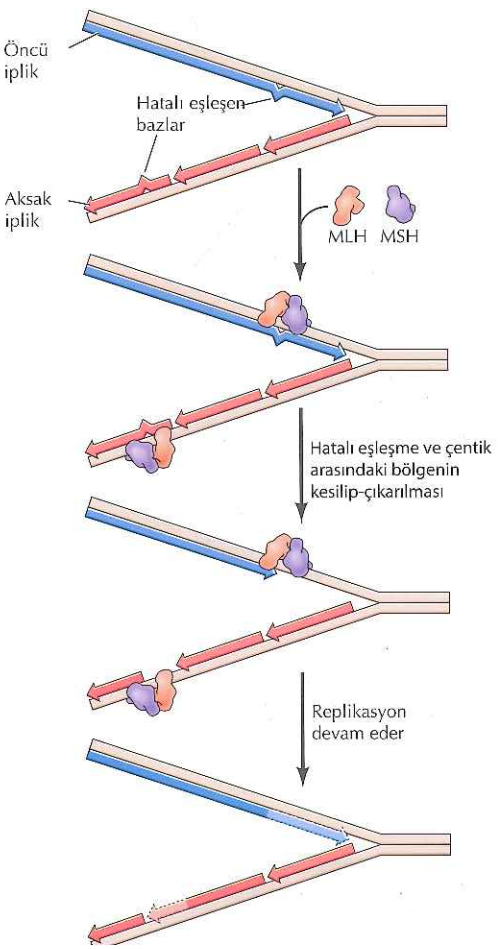


Şekil 7.25 ***E. coli*'de hatalı eşleşme tamiri** Hatalı eşleşme tamir sistemi, yeni replike olan DNA'yı henüz metillenmemiş olmasıyla atasal iplikten ayırt ederek, hatalı eşlemiş bazı bulur ve uzaklaştırır. MutS hatalı eşleşmiş baza bağlandıktan sonra MutL de bağlanır. MutL'nin bağlanması MutH'yi aktive eder, MutH bir metilasyon bölgesinin karşısındaki, modifiye edimemiş ipliği keser. MutS ve MutL bir helikaz ve ekzonükleaz ile birlikte, modifiye edilmemiş ipliğin hatalı eşleşmeyi içeren kısmını keserek çıkarır. Oluşan boşluk daha sonra DNA polimeraz tarafından doldurulur ve ligaz tarafından yapıştırılır.

Video 7.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v7.2
Metil-Güdümlü Hatalı Eşleşme Tamiri *E. coli*'de hatalı eşleşme tamiri yeni sentezlenen DNA ipliğinde metilasyonun olmaması ile kolaylaştırılır.

oluşturmak üzere metillenerek değiştirilmesi esasına dayanır (Şekil 7.25). Metillenme replikasyondan sonra meydana geldiği için, yeni sentezlenen DNA iplikleri metillenmez ve böylelikle hatalı-eşleşme tamir enzimlerince spesifik olarak tanınabilir. Hatalı eşleşme tamiri, hatayı algılayan ve MutH ve MutL olarak adlandırılan diğer iki protein ile kompleks oluşturan MutS proteiniyle başlar. Daha sonra, MutH endonükleaz, metile olmamış DNA ipliğini GATC dizisinden keser. MutL ve MutS daha sonra bir ekzonükleaz ve bir helikazla birlikte, iplikteki kırık ile hatalı eşleşme arasındaki DNA parçasını çıkarırlar, oluşan boşluk DNA polimeraz ve ligaz tarafından doldurulur.

Ökaryotlar da, her ne kadar yeni replike olmuş DNA'yı tanımada kullandığı mekanizma *E. coli* 'ninkinden farklı ise de, benzer hatalı eşleşme tamir sistemine sahiptirler. Ökaryotik hücrelerin MutH homologu yoktur ve hatalı eşleşmenin olduğu iplik DNA metilasyonu ile tanınamaz. Bunun yerine, yeni replike olan DNA'daki tek iplik kırıklarının tamir edilecek ipliği belirlediği düşünülmektedir. MutS ve MutL'in ökaryotik homologları *E. coli*'de olduğu gibi hatalı eşleşmiş baza bağlanır ve tek zincir kırığı ve hatalı eşleşme arasındaki DNA'yı kesip çıkarır (Şekil 7.26). Yeni sentezlenen aksak iplik Okazaki fragmantlarının her iki ucunda da bulunan kırıklardan anlaşılırken öncü iplik büyüyen 3′ ucuyla ayırt edilebilir.



Şekil 7.26 **Memeli hücrelerde hatalı eşleşme tamiri** MutS ve MutL'in ökaryotik homologları (sırasıyla MSH ve MLH) hatalı eşleşmiş bazlara bağlanarak, hatalı eşleşmiş bazlar ve DNA ipliğindeki kırık arasındaki DNA'yı doğrudan kesip çıkarır. Yeni sentezlenmiş aksak iplikteki kırıklar ya Okazaki parçalarının uçlarında ya da sürekli ipliğin büyüyen 3′ ucunda bulunur.

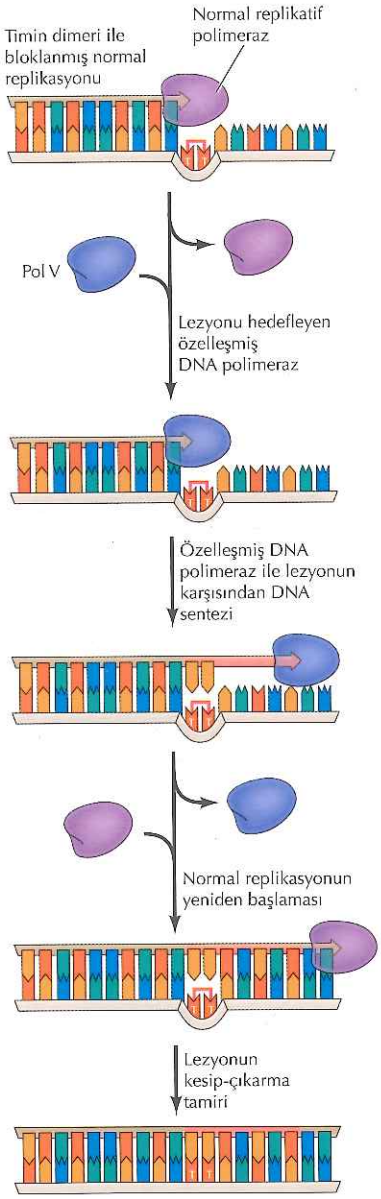
MSH ve *MLH* mutasyonlarının, yaygın bir kalıtsal kolon kanseri tipinin (Herediter non-polipozis kolorektal kanser veya HNPCC) oluşumundan sorumlu olması gerçeği, bu onarım sisteminin önemini göstermektedir. HNPCC en yaygın kalıtsal hastalıklardan biridir, her 200 kişiden birini etkilemektedir ve ABD'deki tüm kolorektal kanserlerin %15'inden sorumludur. Hatalı eşleşme tamir mekanizmasındaki aksaklık ile HNPCC arasındaki ilişki 1993'de iki araştırma grubunun, *MutS*'nin insan eşdeğerini *(MSH)* klonlanmaları ve bu gendeki mutasyonların, bütün HNPCC vakalarının yaklaşık yarısından sorumlu olduğunu bulmaları sonucu keşfedilmiştir. Daha sonraki çalışmalar, geri kalan HNPCC olgularının çoğunun *MutL*'nin homologu olan (MLH) üç insan geninden birindeki mutasyonlardan kaynaklandığını göstermiştir. Bu genlerdeki bozukluğun, hücrenin diğer genlerinde mutasyon sıklığını artırdığı ve bu mutasyonlardan bazılarının en nihayetinde kansere neden olma olasılığının da, bununla uyumlu olarak artacağı düşünülmektedir.

Translezyon DNA sentezi

Doğrudan uzaklaştırma ve kesip-çıkararak tamir sistemleri DNA hasarını replikasyondan önce onarırlar, böylelikle replikatif DNA sentezi kalıp olarak hasarsız DNA ipliği kullanarak gerçekleşebilir. Bu sistemler başarısız olursa, hücrenin replikasyon çatalında hasarlı DNA'yı onarabileceği alternatif mekanizmalar bulunmaktadır. Pirimidin dimerleri ve birçok diğer tip lezyon, DNA polimerazın normal işleviyle kopyalanamaz, böylece replikasyon bu hasarlı bölgeye geldiğinde durur. Bununla beraber, hücreler DNA hasarlı bölgeyi geçerek üzerinden replikasyonu devam ettirebilen bir kaç sıra dışı, özelleşmiş DNA polimeraza da sahiptir. Hasarlı DNA'nın bu özelleşmiş DNA polimerazlar ile replikasyonu **translezyon DNA sentezi** olarak adlandırılır ve hücrenin replikasyon çatalındaki DNA hasarını atlayarak, hatayı replikasyon sonrasında düzeltebileceği bir mekanizma sağlar.

Translezyon DNA sentezinden sorumlu ilk özelleşmiş DNA polimeraz 1999 yılında *E. coli*'de bulunmuştur. DNA polimeraz V olarak adlandırılan bu enzim, aşırı UV radyasyonuna yanıt olarak uyarılmakta ve timin dimerlerinin karşısında yeni DNA ipliğinin sentezini gerçekleştirebilmektedir (**Şekil 7.27**). Diğer iki *E. coli* DNA polimerazı, Polimeraz II ve IV de benzer bir şekilde DNA hasarı ile uyarılırlar ve translezyon sentezinde görev alırlar. Ökaryotik hücrelerde de çok sayıda özelleşmiş DNA polimeraz bulunmaktadır ve beraber bunlardan en az beş tanesinin memeli hücrelerinde translezyon sentezinde görevi olduğu gösterilmiştir. Bu özelleşmiş DNA polimerazlar, DNA hasarı bölgesinde duraklamış normal bir DNA polimerazın yerine geçerler. Sonrasında hatanın bulunduğu bölgeyi geçerek sentez yapabilirler, bundan sonra normal replikatif polimerazlar ile yer değiştirirler.

Tüm özelleşmiş DNA polimerazlar da hasarsız DNA'yı kopyaladıklarında doğruluk düşüktür ve 3′den 5′ne hata düzeltme aktiviteleri yoktur (bkz. Şekil 7.11), bundan dolayı hata oranları normal replikatif DNA polimerazlara (örn., *E. coli*'deki polimeraz III ya da ökaryotlardaki polimeraz δ ve ε) kıyasla 100 ile 10.000 kez daha fazladır. Bununla birlikte, hasarlı



Şekil 7.27 Translezyon DNA sentezi Normal replikasyon timin dimeri tarafından bloklanır, fakat DNA polimeraz V (pol V) gibi özelleşmiş DNA polimerazlar durumu algılar ve lezyonu geçerek senteze devam eder. Replikasyon normal replikatif DNA polimeraz tarafından kaldığı yerden devam eder ve hemen sonrasında timin dimeri nükleotid kesip çıkarma tamiri ile ortadan kaldırılır.

Moleküler Tıp

Kolon Kanseri ve DNA Onarımı

Hastalık

Kolon ve rektum kanserleri (kolorektal kanserler) batı ülkelerindeki en yaygın kanser tiplerindendir ve birleşik devletlerde, her yıl yaklaşık 150.000 vaka rapor edilmektedir (toplam kanser olgularının yaklaşık %10'u). Kolon kanserlerinin çoğu (diğer kanser tipleri gibi) kalıtsal hastalık değildir, yani ebeveynlerden çocuklarına doğrudan aktarılmaz. Bununla birlikte, kolon kanserinin iki kalıtsal formu tanımlanmıştır. Her iki sendromda da, kansere yatkınlık geninin kalıtılması kanser gelişme olasılığını artırmaktadır. Kolon kanserinin kalıtımsal formlarından biri (ailesel adenomatoz polipozis) oldukça nadirdir, toplam kolon kanseri olgularının % 1'inden daha azdır. Kolon kanserinin ikinci kalıtımsal formu (kalıtsal non-polipsiz kolorektal kanser veya HNPCC) daha yaygındır ve bütün kolon kanser olgularının %15'ini oluşturmaktadır. Aslında HNPCC, 200 kişiden birini etkiler ve en yaygın kalıtsal hastalıklardan biridir. Her ne kadar kolon kanserleri bu hastalığın en genel klinik formu ise de, etkilenmiş bireyler endometriyum ve over kanserlerinin de dahil olduğu birçok kanser tipine yakalanma riski taşırlar.

Moleküler ve Hücresel Temel

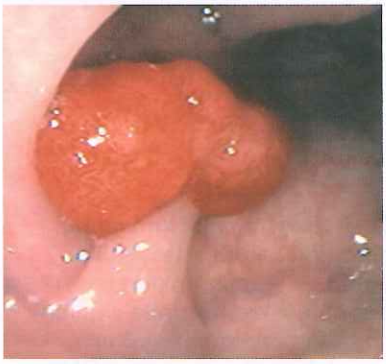
Diğer kanserler gibi, kolorektal kanserler de hücre çoğalmasını düzenleyen genlerde ortaya çıkan ve kanser hücresinin kontrolsüz çoğalmasına yol açan mutasyonların sonucudur. Birçok vakada bu mutasyonlar, somatik hücrelerde sporadik olarak görülür. Ancak kalıtımsal kanserlerde, kalıtılan germ-hattı mutasyonlar, bireyi kanser gelişimine yatkın hale getirmektedir.

1993 yılında HNPCC vakalarının yaklaşık %50'sinden sorumlu olan ve DNA'nın hatalı eşleşme onarımında rol alan bir enzimi kodlayan genin saptanması ile önemli bir gelişme kaydedildi. Bu gen *E. coli MutS* geninin insan homologuydu. Daha sonraki çalışmalar, geri kalan HNPCC vakalarının çoğundan sorumlu olan *MutL* homoloğu olan ve dolayısıyla hatalı eşleşme tamir yolağında görevli olan üç başka genin olduğunu gösterdi. Bu genlerdeki bozukluklar diğer hücresel genlerde mutasyon sıklığının artmasına neden olmakta ve bu mutasyonlardan bazılarının hücre proliferasyonunu düzenleyen genleri etkileyerek, sonuçta kanser gelişimine yol açmaktadır.

Önlem ve Tedavi

Diğer kalıtsal hastalıklarda olduğu gibi, HNPCC'den sorumlu genlerin tanımlanması, genetik testlerle bu kalıtsal kanser riskini taşıyan bireylerin saptanmasına olanak sağlar. Hatta, doğum öncesi genetik tanı, bir aile kurmak isteyen HNPCC mutasyonu taşıyıcıları için çok önemli olabilir. Bununla beraber, bu mutasyonların saptanmasının potansiyel getirileri yalnızca, mutant genlerin bir sonraki nesle aktarılmasının engellenmesi ile sınırlı değildir, aynı zamanda etkilenmiş bireylerde kanser gelişiminin önlenmesine de yardımcı olabilir.

Hastalıktan korunma açısından, kolon kanserinin en önemli özelliği yıllar boyunca kademeli gelişim göstermesidir. Hastalığın erken tanısı, hastanın hayatta kalma şansını önemli ölçüde artırmaktadır. Kolon kanser gelişiminin başlangıç aşaması, küçük, benign poliplerin büyümesidir ki bunlar, daha sonra malign karakter kazanarak çevre bağ dokusuna invaze olurlar. Malign karakter gelişmeden önce, polipler operasyonla kolaylıkla uzaklaştırılarak bir malign tümörün gelişmesi etkin biçimde engellenebilir. Kolon kanserinin erken aşamaları ve polipler, kolonun ışıklandırılmış ince bir tüple incelenmesi (kolonoskopi) ile saptanabilir, böylelikle HNPCC hastalarında sık kolonoskopi yapılarak polipler kanseri gelişiminden önce uzaklaştırılabilir. Ayrıca, HNPCC hastaları için önemli faydaları olabilecek birkaç ilacın, kolon kanser gelişiminin potansiyel inhibitörleri olarak, testleri devam etmektedir. HNPCC'den sorumlu mutasyonların saptanması, gibi koruyucu önlemlerin zamanında uygulanması, hastalıktan korunmada önemli katkılar sağlayabilir.

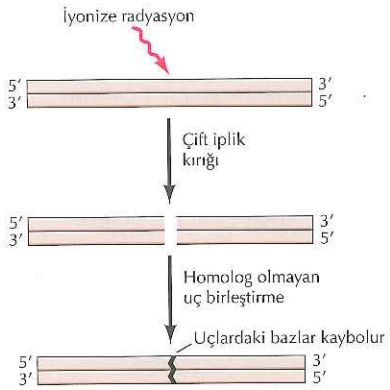


Kolonoskopi ile görüntülenen bir kolon polipi.

DNA'da timin dimerleri gibi bazı lezyonların karşısına doğru bazı yerleştirme hususunda seçicidirler. Bu yüzden, özelleşmiş polimerazlar DNA hasarının bazı formlarının karşısına doğru bazı yerleştirebilmelerine rağmen, diğer bazı tip DNA hasarlarının karşısına baz yerleştirmede veya normal hasarsız DNA'nın replikasyonu esnasında "hata eğilimli"dirler.

Çift iplik kırıklarının tamiri

Çift iplik kırıkları DNA hasarının en tehlikeli formudur, çünkü DNA molekülünün sürekliliği her iki iplikteki kırıklarla bozulmuştur. Bu gibi DNA kırıkları DNA replikasyonu esnasında doğal olarak oluşur. Örneğin, replikasyon

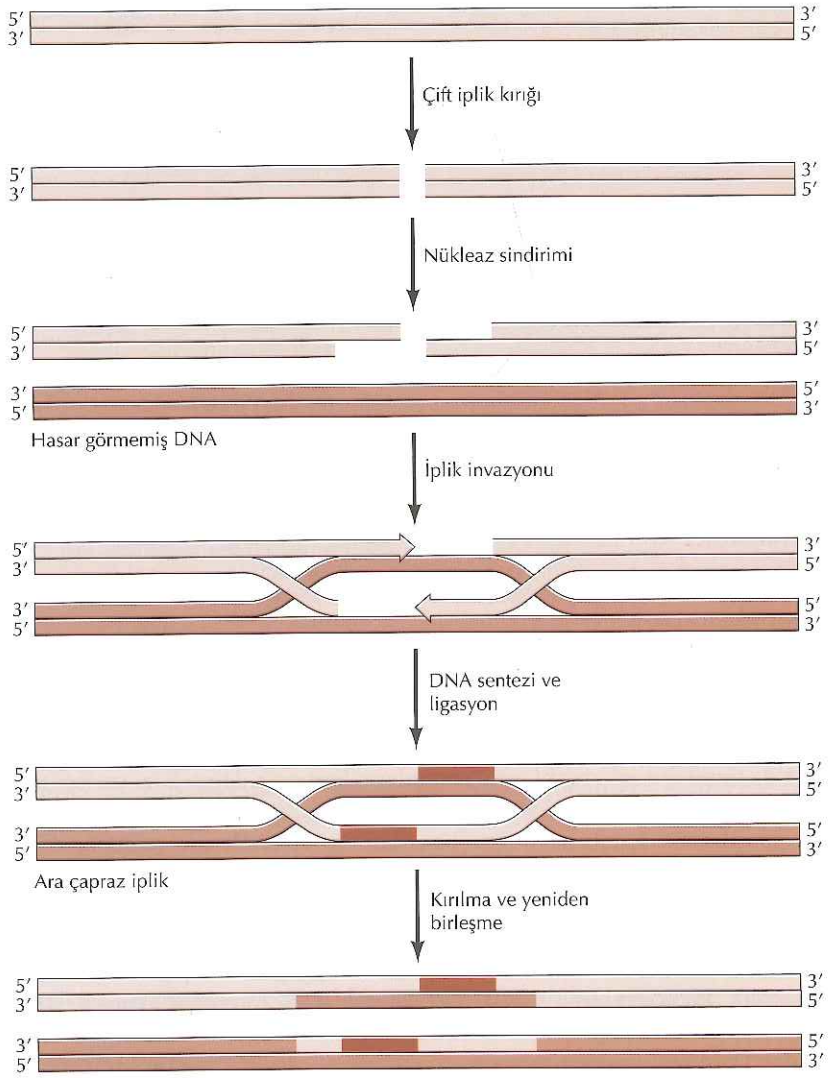


Şekil 7.28 Çift iplik kırıklarının homolog olmayan uç birleşmesi ile tamiri İyonize radyasyon ve bazı kimyasallar DNA'da çift iplik kırıklarına sebep olurlar. Bu kırıklar, kırılan molekülün uçlarının homolog olmayan uç birleşmesi ile tekrar birleştirilmesi ile tamir edilebilir. Ancak bu onarım, genellikle hasarın olduğu bölgede baz kaybına yol açar.

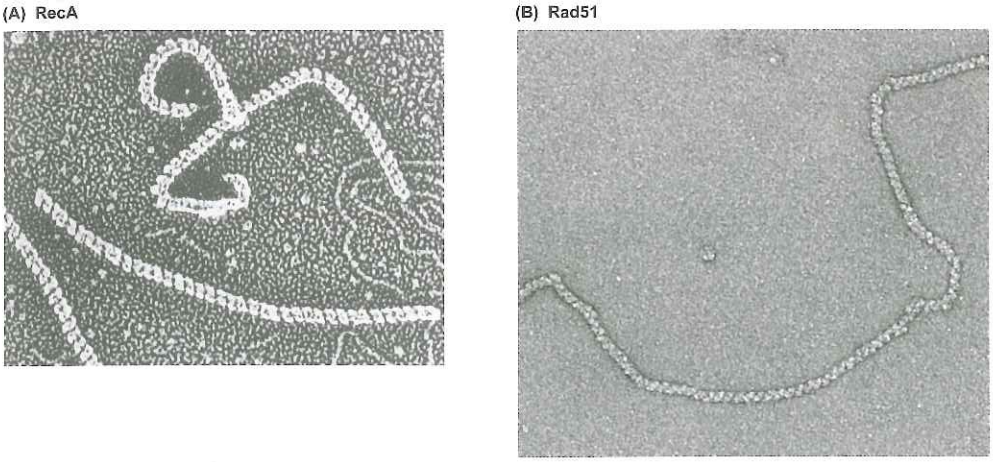
çatalındaki DNA polimerazın kalıp DNA ipliğinde bir kesik ile karşılaştığı zaman. Buna ilaveten, çift iplik kırıkları iyonize radyasyon (X-ışınları gibi) ve DNA'nın karşıt ipliklerinde kırık oluşturararak DNA'ya zarar veren bazı kimyasallarla da oluşur.

Çift iplik kırıklarının DNA'nın her iki ipliğini de etkilemesinden dolayı, hasarlı bölgenin karşısındaki DNA sentezine gerek duyan mekanizmalar ile tamir edilemez. Bunun yerine çift iplik kırıkları, kırık iplikleri birleştiren **rekombinasyonel tamir** denilen, farklı bir mekanizma ile tamir edilir. Hücreler iki ana yolağı rekombinasyonel tamir için kullanırlar. En basit durumda, DNA çift iplik kırıkları bir tek DNA molekülünün kırılmış uçlarının tekrar birleştirilmesiyle tamir edilebilir (Şekil 7.28). Ancak, bu mekanizma hasar bölgesindeki bazların kaybına neden olduğundan hata oranının yükselmesine neden olur.

Alternatif olarak, çift iplik kırıkları hasar görmemiş kromozomdaki DNA dizilerini kullanarak gerçekleşen ve böylelikle hasarın tamir edilmesi ve normal DNA sekansının korunmasını sağlayan **homolog rekombinasyon** ile de tamir edilebilir (Şekil 7.29). Ökaryotik hücrelerde bu tip tamir mekanizması



Şekil 7.29 Çift iplik kırıklarının homolog rekombinasyon ile tamiri Çift iplik kırıkları hasar görmemiş kromozomla yapılan homolog rekombinasyon ile onarılabilir. Bu da normal DNA dizisinin geri kazanılmasını sağlar. Çift iplik kırıklarındaki her iki DNA ipliği de nükleazlar tarafından 5′den 3′ yönünde sindirilir. Daha sonra sarkan 3′ ucu diğer atasal moleküle homolog baz eşleşmesi ile invaze olur. Sonrasında, boşluklar tamir sentezi ile doldurulup, ligasyonla birleştirilerek ara çapraz-iplik oluşturur. Çapraz ipliklerin ayrılması ve yeniden yapıştırılması sonrasında rekombinant moleküler oluşur.



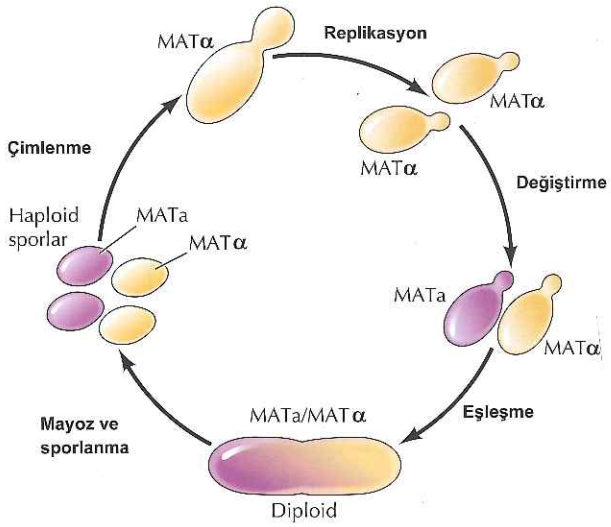
Şekil 7.30 RecA ve Rad51 protein-DNA filamanları *E. coli* RecA (A) ve insan Rad51 (B) proteinlerinin DNA'ya bağlanmasıyla oluşan filamanların elektron mikrografları.(A. Stasisk ve S. West'in izinleri ile)

yalnızca yeni replike olmuş kardeş kromatidlerin birbirleriyle etkileşim halinde bulundukları durumda, DNA replikasyonunun hemen sonrasında, geçerlidir (bkz. Şekil 6.23). Homolog rekombinasyon iki atasal DNA molekülünün kırılması ve tekrar birleşmesiyle sonuçlanır. Bu da iki atasal kromozom arasında genetik bilginin tekrar karışması ile sonuçlanır. Süreç hem DNA tamirinde hem de mayozda homolog kromozomlar arasındaki rekombinasyonda oluşan çift iplik kırıkları ile başlatılır (Bölüm 17'de tartışıldı). Çift iplik kırıklarının bulunduğu her iki iplik de ilk olarak 3′ ucunda tek iplikli çıkıntılar oluşturmak üzere DNA'yı 5′ den 3′ yönünde sindiren ekzonükleazlar tarafından sindirilir. Bu tek iplikler diğer atasal molekülü homolog baz eşlemesi ile invaze olurlar. Boşluklar daha sonra tamir senteziyle doldurulur ve iplikler rekombinant ürün oluşturmak üzere ligasyonla birleştirilir.

Homolog rekombinayonda yer alan kilit protein *E. coli*'de **RecA** ya da ökaryotlarda **Rad51**'dir. Bu proteinler tek iplikli DNA'ya bağlanarak protein-DNA filamanlarını oluştururlar (**Şekil 7.30**). Sonra, ikinci bir çift iplikli DNA molekülüne bağlanarak iki DNA arasında bir kompleks oluşturular ve homolog sekanslar arasında iplik değiş tokuşunu katalizlerler. Burada kalıtsal meme kanserinden sorumlu genlerden birinin (*BRCA2*) kodladığı proteinin, Rad51'in çift iplik kırıkları esnasında oluşan tek iplikli DNA'ya getirilmesinde rol alması özellikle önemlidir. Bu veri, bu tip DNA tamirindeki bozuklukların kadınlarda en sık görülen kanserlerden birine neden olabileceğini desteklemektedir.

DNA Yeniden Düzenlenmeleri

Homolog kromozomlar arasındaki rekombinasyon, mayoz ya da DNA tamiri esnasında, genom içerisinde genlerin düzenini değiştirmeden, kromozom çiftleri arasında genlerin yeniden dağılımını sağlamaktadır. Bunun aksine, diğer tip rekombinasyon olayları, genomik DNA'nın yeniden düzenlenmesine yol açmaktadır. Bazı DNA yeniden düzenlenmeleri, spesifik hücre tiplerinde gen ekspresyonunun kontrolünde önemlidir, bazıları ise genetik çeşitliliğe katkıda bulunarak, evrim sürecinde rol oynayabilir.



Şekil 7.31 *S. cerevisiae*'nin hayat döngüsü Haploid MATα mayasının MATα popülasyonu oluşturmak için replikasyonu. Eşleşme tipi lokusundaki değişme ile oluşan MATa ve MATα haploidleri eşleşerek MATa/MATα diploitlerini oluşturur. Besin açlığı gibi durumlarda, diploid maya mayoza girerek dört haploid spor oluşturur. Uygun koşullarda sporlar gelişir ve haploid olarak replike olurlar.

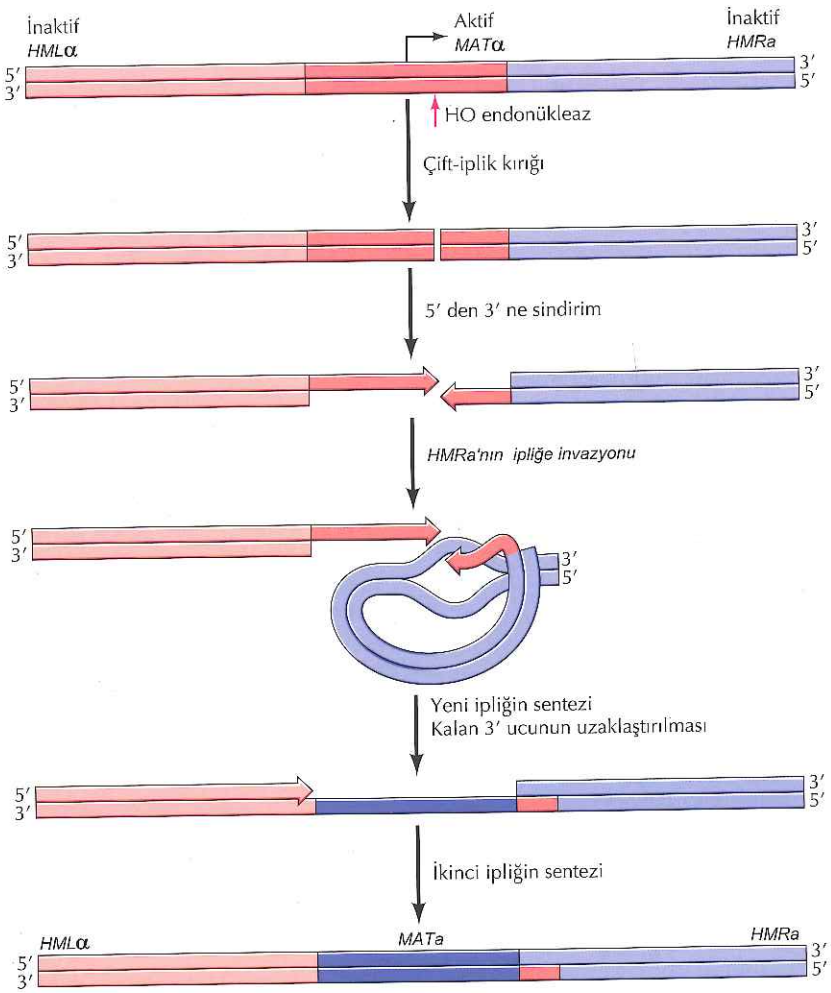
Genlerin değişik kromozom bölgelerine hareket edebileceğinin keşfi, 1940'larda Barbara McClintock'un mısırla yaptığı çalışmalarla sağlandı. McClintock tümüyle genetik analizlere dayanarak, genom içerisinde değişik konumlara hareket edip, yakınındaki genlerin ekspresyonunu değiştiren, yeni bir genetik eleman tanımladı. Neredeyse 30 yıl sonra McClintock'un çalışmasının fiziksel temeli anlaşıldı. Bunun için, bakterilerde yer değiştiren elemanların (*transposable elements*) keşfedilmesi ve bilim insanlarınca hareket eden genetik elemanlar kavramının kabul görmesi gerekti. McClintock tarafından ilk kez tanımlanan elemanların yer değiştirmesi dahil, DNA yeniden düzenlenmelerinin bir kaç tipi bu gün hem prokaryot hem de ökaryot hücrelerde tanımlanmıştır. Hatta günümüzde yer değiştirebilen elemanların bitki ve hayvanların genomların geniş bölümünü oluşturduğu, insan genomunun ise neredeyse yarısını kapsadığı bilinmektedir (bkz. Tablo 6.3).

Bölüm 6'da bahsedildiği gibi, kromozomal DNA içinde rastgele yeni konumlara gidebilen yer değiştirebilen elemanlar, genomlarımızın evriminde temel rolü oynamıştır. Ancak, genel olarak içinde hareket ettikleri hücrelere faydalı bir rol oynamazlar. Buna karşın, aşağıda anlatıldığı gibi, programlanmış DNA yeniden düzenlenmeleri gelişimde ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli roller oynayabilir.

Maya eşleşme tipleri

Maya eşleşme tiplerinin kontrolü, homolog rekombinasyon ile özgül diziler arasında (**bölgeye-özgül rekombinasyon**) gerçekleşen programlı DNA yeniden düzenlemeleri için iyi çalışılmış bir örnektir. *S.cerevisiae* haploid ya da diploid olarak mitoz ile replike olabilir (**Şekil 7.31**). Diploid hali besin olmaması gibi stres koşullarında avantaj sağlar. Çünkü diploid hücreler mayoza girebilirler ve koşullar iyileştiğinde çimlenebilen dört haploid spor oluşturabilirler. Diploidler, eşleşme-tipi lokusunda (*MAT*) hangi allelin eksprese olduğuna bağlı olarak, MATa ve MATα denilen iki farklı eşleşme tipindeki iki haploid hücrenin eşleşmesiyle oluşur. En önemlisi, haploid mayanın MATa ve MATα eşleşme tipleri arasında değiş tokuş yapabilmesidir. Bu özellik, tek bir koloniden elde edilen hücrelerin, MATa ve MATα mayaları içeren ve diploidleri oluşturma kapasitesindeki karışık bir populasyon oluşturmalarını sağlar.

Eşey tipi değişiminin moleküler temeli *S.cerevisia*'nın 3. kromozomundaki üç eşleşme lokusu arasında gerçekleşen bölgeye özgül rekombinasyondur (**Şekil 7.32**). Bu lokuslardan biri (*MAT*) transkripsiyonel olarak aktiftir ve *MAT* lokusundaki allelin tipi (*MATa* ya da *MATα*) haploid hücrenin fenotipini belirler. Diğer iki lokus (*MHRa* ve *HMLα*) transkripsiyonel olarak inaktiftirler ve sırasıyla *MATa* ve *MATα* eksprese olmayan allelerini içerirler. Eşleşme tipi değişimi *MAT* lokusundaki aktif alleller ve *HMRa* veya *HMLα*'daki alternatif inaktif alleller arasındaki rekombinasyon ile düzenlenir. Bu süreç, çift iplik kırığı oluşturmak



Şekil 7.32 Eşleşme tipinin değiştirilmesi *S.cerevisiae*'nın bir aktif MAT lokusu (örnekte gösterilen *MATα*) ve iki inaktif lokusu (*HMLα* ve *HMRa*) vardır. Değiş tokuş aktif *MAT* lokusunda çift iplik DNA kırığı oluşturan HO endonükleaz tarafından başlatılır. Kesikteki her iki DNA ipliği de 5′ den 3′ yönünde nükleazlarla 3′ uçlarında bir çıkıntı olacak şekilde sindirilirler. Bu 3′ uçlardan biri alternatif inaktif allele invaze olarak, bu durumda *HMRa*, yeni ipliğin sentezini *HMRa*'yı kalıp olarak kullanarak gerçekleştirir. Geride kalan 3′ uç ortadan kaldırılır ve DNA'nın ikinci ipliği sentezlenir. Sonuç, *MAT* lokusunun yeni bir kopyanın sentezlenmesidir, bu da *MATa*'ya değişim ile sonuçlanır.

için DNA'yı aktif *MAT* lokusundan kesen HO denilen bir endonükleaz tarafından başlatılır. Daha sonra oluşan tek zincir, 5′den 3′e ekzonükleazlarca çıkarılır ve boşluk inaktif alternatiflerden ya *HMRa* ya da *HMLα* allellerinin verici olarak kullanılması ile yeni bir kopyanın sentezlenmesi ile doldurulur. Sonuçta, *HMRa* ve *HMLα* her ikisi de, orijinal durumlarını korumaya devam ederken, orijinal *MAT* alleli (örn. *MATa*) alternatif allel (örn. *MATa*) ile yer değiştirir.

Antikor genleri

Yabancı maddeleri (**antijenler**) tanıyarak, bulaşıcı (enfektif) ajanlara karşı korunma sağlayan omurgalı bağışıklık sisteminin gelişimi, yüksek

Anahtar Deney

İmmünglobulin Genlerinin Yeniden Düzenlenmesi

Evidence for Somatic Rearrangement of Immunoglobulin Genes Coding for Variable and Constant Regions

Nobumichi Hozumi and Susumu Tonegawa
Basel Institute for Immunology, Basel, Switzerland
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Volume 73, 1976, pages 3628-3632

Bağlam

Omurgalı immün sisteminin sonsuz gibi gözüken yabancı molekülleri tanıyabilme yeteneği, lenfositlerin buna uygun olarak çok çeşitli antikorları üretebildiği anlamına gelmektedir. Antikor çeşitliliği immün tanımanın anahtarı olduğundan, genomik DNA'da sınırsız sayıda farklı immünglobulinin kodlanma mekanizmasının anlaşılması, immünolojinin temel konularından biridir.

Hozumi ve Tonegawa'nın deneylerinden önce immünglobulinlerin protein dizi analizi, ağır ve hafif zincirlerin her ikisinin de farklı değişken ve sabit bölgeler içerdiklerini göstermiştir. Genetik çalışmalar farelerin, sabit-bölge genlerinin yalnızca tek kopyasını kalıttığını göstermiştir. Bu gözlem, immünglobulinlerin tek bir sabit bölge ile bağlanan çok sayıda değişken bölge genlerince kodlandığı şeklinde bir öneriyi gündeme getirmiştir. Hozumi ve Tonegawa tarafından immünglobulin gen yeniden düzenlenmelerinin keşfi, bu hipoteze ilk doğrudan deneysel desteği sağlamış ve antikor çeşitliliğinin moleküler temellerinin anlaşılması için altyapı oluşturmuştur.

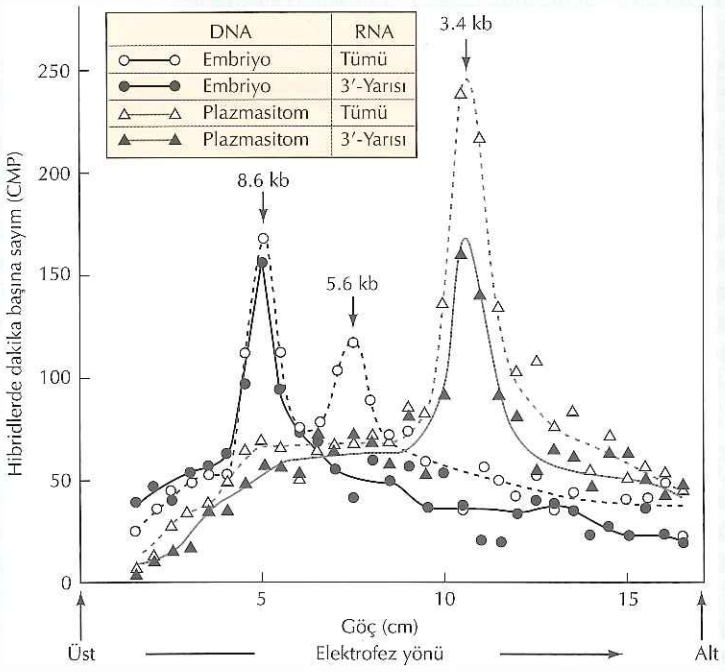
Deneyler

Hozumi ve Tonegawa, immünglobulin değişken ve kararlı bölgelerini kodlayan genlerin, lenfosit gelişimi sürecinde, DNA düzeyinde birleşme olasılığını test ettiler. Deneysel yaklaşımları, fare plazmasitom (tek tip immünglobulin üreten bir B lenfosit tümörü) hücreleri ve fare embriyolarından elde ettikleri DNA'larda değişken ve sabit bölge dizilerinin organizasyonlarının restriksiyon enzimler kullanılarak karşılaştırılmasıydı. Embriyo ve plazmasitom DNA'ları, *Bam*HI restriksiyon enzimi ile kesildi ve değişik büyüklükteki DNA parçaları agaroz jellerde elektroforez ile ayrıldı. Jel daha sonra ince dilimlere kesildi ve her dilimden izole edilen DNA, plazmasitom hücrelerinden izole edilen immünglobulin mRNA'sından hazırlanmış olan radyoaktif işaretli problar ile hibridize edildi. Birisi tüm immünglobulin mRNA'alarını, diğeri mRNA'nın yalnızca sabit bölge dizilerini barındıran 3′ yarısını kapsayan iki prob kullanıldı.

Önemli bulgu, embriyo ve plazmositom DNA'larında sabit bölge ve değişken bölge dizilerinin tümüyle farklı düzende olduğunun saptanmasıydı (şekle bakınız). Embriyo DNA'sında tam prob,

Susumu Tonegawa

sırasıyla, yaklaşık 8.6 ve 5.6 kb'lık iki *Bam*HI fragmanı ile hibridize oldu. Yanlızca 8.6 kb'lık fragman 3′ probu ile hibridize oldu ki bu, 8.6 kb'lık fragmanın sabit bölge dizilerini barındırdığını ve 5.6 kb'lık fragmanın değişken bölge dizilerini içerdiğini belirtiyordu. Çarpıcı zıtlık ise, her iki probun da plazmositom DNA'sında tek bir 3.4 kb'lık fragman ile hibridize olmasıydı. Bu sonuçlar, değişken ve sabit bölge dizilerinin embriyoda ayrı olduğu, fakat lenfosit gelişimi sürecinde tek bir immünglobulin geni oluşturmak üzere, yeniden düzenlenmiş olduğu şeklinde yorumlandı.



BamHI ile kesilen ve plazmasitom mRNA'sının tamamına ya da 3′ yarısına karşı gelen problarla hibridize edilen embriyo ve plazmasitom DNA'larının jel elektroforezi. Sonuçlar, her jel diliminde, DNA ile hibridleşen moleküllerde belirlenen radyoaktivite olarak gösterildi.

Anahtar Deney

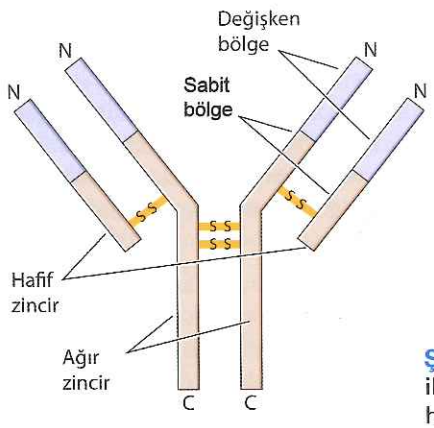
Etki

Hozumi ve Tonegawa' nın, göreceli olarak dolaylı restriksiyon endonükleaz haritalamaya dayalı ilk sonuçları, immünglobulin genlerinin dizi analizleri ve moleküler klonlama çalışmaları ile doğrulandı ve detaylandırıldı. Benzer çalışmalar bu gün, bu genlerin B lenfositlerde DNA' nın farklı bölgeleri arasında bölgeye-özgül rekombinasyon ile bir araya geldiklerini, şüpheye yer bırakmayacak şekilde göstermiştir. T lenfositlerde benzer DNA yeniden düzenlenmeleri, T hücre reseptörlerini kodlayan genlerin oluşmasını sağlar. Böylece, bölgeye-özgül rekombinasyon ve programlanmış gen yeniden düzenlenmeleri immün sistemin gelişimine temel oluşturur.

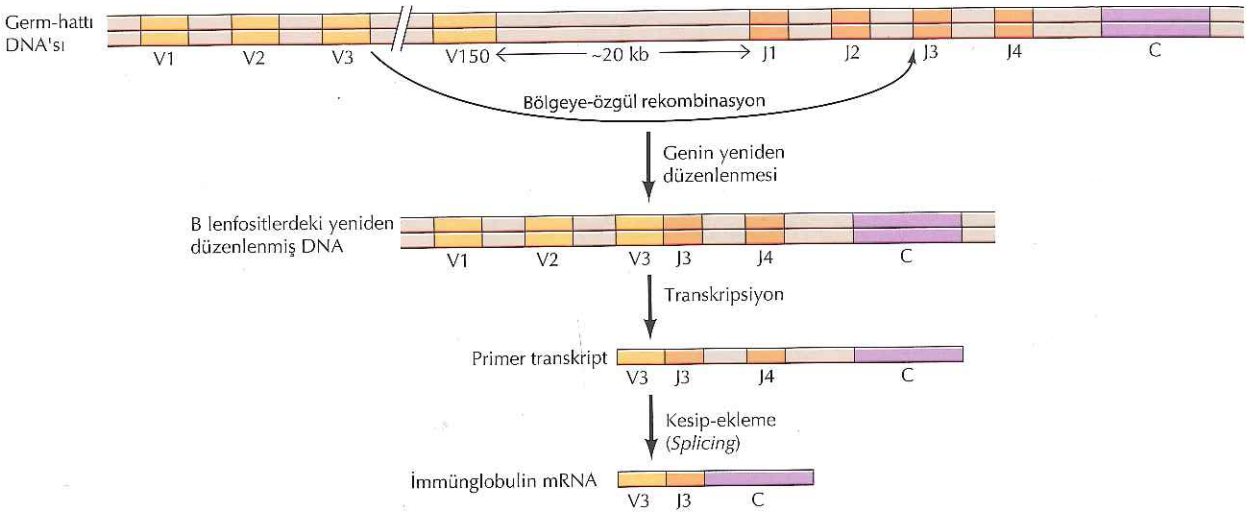
Daha ileri çalışmalar, immünglobulin ve T hücre reseptörlerinin değişken bölgelerinin, DNA' nın iki veya üç farklı bölümünün yeniden düzenlenmesiyle oluştuğunu göstermiştir. Bu bölümlerin yeniden bir araya gelebilmeleri, rekombinasyon bölgesindeki yüksek mutasyon frekansıyla birlikte, T hücre reseptör ve immünglobulin çeşitliliğinin oluşumundan büyük ölçüde sorumludur. İmmünglobulin genlerinin yeniden düzenlenmesinin keşfi, immün sistemin yabancı maddeleri ne şekilde tanıyıp, neredeyse sınırsız miktarda yanıt oluşturabildiğinin anlaşılmasına temel oluşturmuştur.

ökaryotlarda programlanmış DNA yeniden düzenlenmeleri için gösterilen ana örnektir. B ve T lenfositler tarafından yönlendirilen iki ana immün yanıt tipi vardır. B lenfositler çözünen antijenlerle tepkimeye giren antikorları **(immünglobulinler)** salgılarlar, T lenfositler ise, diğer hücrelerin yüzeylerinde sergilenen antijenlerle reaksiyona giren hücre yüzey proteinlerini **(T hücre reseptörleri** olarak adlandırılan) üretirler. İmmünglobulinlerin ve T hücre reseptörlerinin her ikisinin temel özellikleri, çok geniş bir çeşitliliğe sahip olmalarıdır. Bu sayede pek çok farklı yabancı antijeni tanıyabilen antikorlar ve T hücre antijenleri oluşabilmektedir. Örneğin, her birey 10^{11} den fazla değişik antikor molekülü üretebilme kapasitesine sahiptir ki bu sayı, insan genomunda yer alan genlerin toplam sayısının (~21.000) çok üzerindedir. Bu çok çeşitli antikorlar (ve T hücre reseptörleri) germ hattı DNA'sında kodlanmaz, bağışıklık sisteminin gelişimi sırasında, T hücre reseptör ve immünglobulin genlerinin farklı bölgeleri arasında bölgeye-özgül rekombinasyon ile oluşan, benzersiz lenfosit genlerince kodlanmaktadır.

İmmünglobulin genlerinin yapılanmasında bölgeye-özgül rekombinasyonun rolü, ilk kez 1976'da Susumu Tonegawa tarafından gösterildi. İmmünglobulinler, birbirinin aynı ağır ve hafif polipeptid zincir çiftlerinden oluşur (Şekil 7.33). Hem ağır hem de hafif zincirler, sabit (constant) C-ucu bölgeler ile değişken (variable) N-ucu bölgelerin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Farklı immünglobulin moleküllerinde farklı amino asitleri barındıran değişken bölgeler, antijen bağlama görevi yapan kısımlardır ve farklı antikorların benzeri olmayan antijenleri tanımasının sebebi, değişken bölgedeki amino asit dizilerinin çeşitliliğidir. Her



Şekil 7.33 Bir immünglobulin yapısı İmmünglobulinler disülfid bağları ile bağlanmış iki ağır zincir ve iki hafif zincir içerirler. Hem ağır hem de hafif zincirleri değişken N-ucu ve sabit C-ucu bölgelerine sahiptirler.



Şekil 7.34 İmmünglobulin hafif-zincir genlerinin yeniden düzenlenmesi Her bir hafif zincir geni (fare κ hafif zincir geni görülmektedir), bir sabit bölge (C), bir bağlantı bölgesi (J) ve bir değişken bölgeden (V) oluşur. Germ hattı DNA'sında J ve C'den yaklaşık 20 kb uzakta, 150 farklı V bölgesi bulunur. B lenfosit gelişimi sürecinde, bölgeye-özgül rekombinasyon V bölgelerinden birini dört J bölgesinden birine bağlar. Yeniden düzenleme transkripsiyonu aktive eder ve sonuçta, yeniden düzenlenmiş VJ bölgesiyle birlikte, kalan J bölgelerini ve C'yi kapsayan bir primer transkript oluşur. Kullanılmayan J bölgeleri ile, J ve C arasındaki intronlar kesip-ekleme (*splicing*) ile uzaklaştırılarak işlevsel mRNA elde edilir.

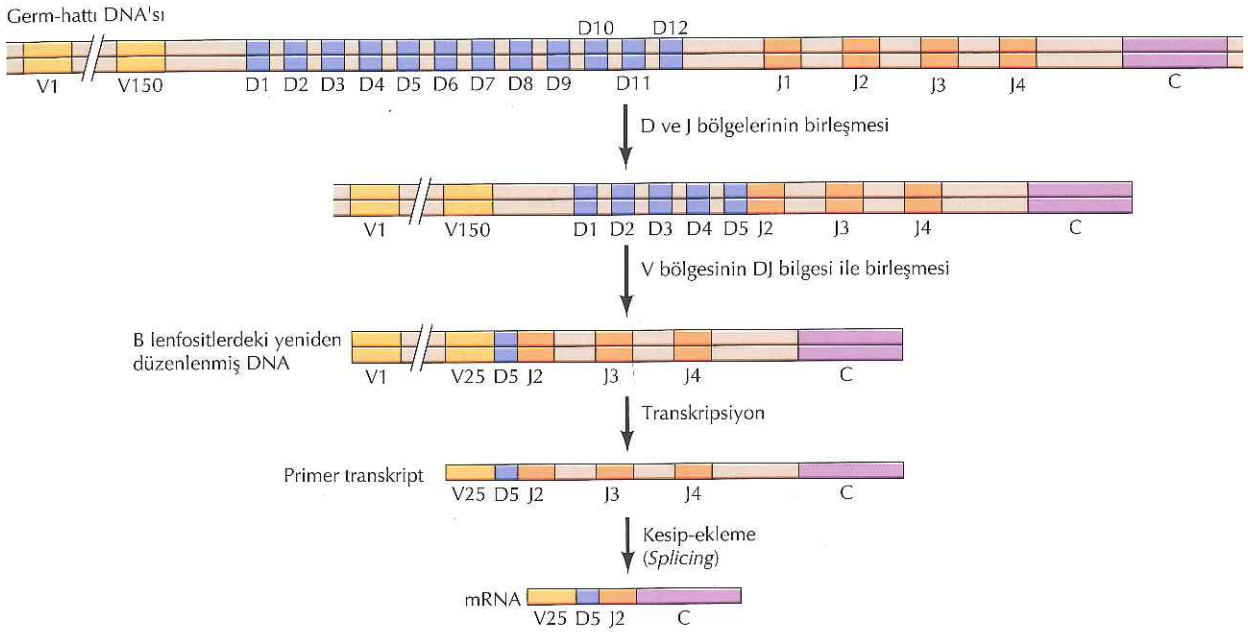
Animasyon 7.2
sites.sinauer.com/cooper7e/a7.2
Hafif Zincir Genleri B hücresi gelişimi esnasında bölgeye özgül rekombinasyon ile immünglobulin hafif zincir genleri birleşerek özgün immünglobulin hafif zincirlerin oluşmasını sağlar.

bireyin çok geniş bir dağılımda farklı antikorlar üretme yeteneğine karşın, her B lenfosit yalnızca tek tip antikor üretir. Tonegavva'nın önemli buluşu, her bir antikorun B lenfosit gelişimi sürecinde bölgeye-özgül rekombinasyon ile oluşturulmuş münferit genlerce kodlanmasıdır. Bu gen yeniden düzenlenmeleri, her bir B lenfositte farklı immünglobulin genleri oluşturur ve böylece, insan vücudunda yaklaşık 10^{12} B lenfositlik bir populasyon, çok geniş bir yelpazede yabancı antijene karşı antikor üretebilme kapasitesi sağlar.

İmmünglobulin hafif zincirini kodlayan genler üç bölgeden oluşur: polipeptid değişken bölgesinin 95 ila 96 N-terminal amino asidini kodlayan bir V bölgesi, polipeptid değişken bölgesinin C-ucundaki 12 ila 14 amino asidi kodlayan bir bağlantı (J) bölgesi ve polipeptid kararlı bölgesini kodlayan bir C bölgesi (Şekil 7.34). Farede hafif zincir genlerinin majör tipi yaklaşık 150 V, 4J ve bir tek C bölgesinin kombinasyonuyla oluşur. Lenfosit gelişimi sürecinde bölgeye-özgül rekombinasyon, fonksiyonel bir hafif zincir geni oluşturmak üzere, tek bir V bölgesinin tek bir J bölgesiyle rekombinasyonunu sağlar. Farklı B lenfositlerde değişik V ve J bölgeleri rekombinasyonla birleştirilebildiğinden, 150 V bölgesinin 4J bölgesiyle oluşturacağı hafif zincir kombinasyonu olasılığı yaklaşık 600 (4x150)'dir.

Animasyon 7.3
sites.sinauer.com/cooper7e/a7.3
Ağır Zincir Genleri Üç bölge arasında gerçekleşen bölgeye özgül rekombinasyon ile immünglobulin ağır-zincir genlerinin oluşmasını sağlar.

Ağır-zincir genleri, V ve J arasında yer alan amino asitleri kodlayan, dördüncü bir bölgeye (değişkenlik veya D bölgesi olarak bilinir) sahiptir (Şekil 7.35). İşlevsel bir ağır zincir genin kurulumu iki rekombinasyon olayını gerektirir: Önce bir D bölgesi bir J bölgesiyle birleşir ve daha sonra bir V bölgesi, düzenlenmiş olan DJ parçasına bağlanır. Farede yaklaşık 500 ağır



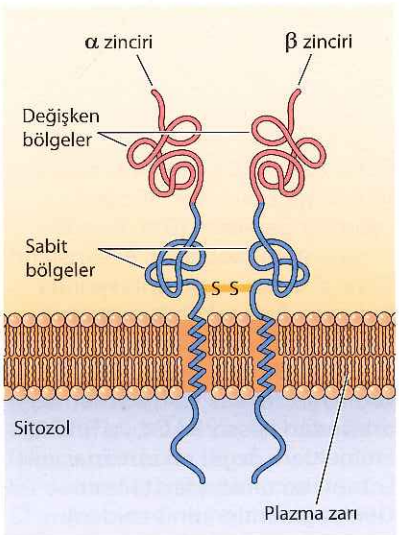
Şekil 7.35 İmmünglobulin ağır zincir genlerinin yeniden düzenlenmesi Ağır zincir genleri V, J ve C bölgelerine ek olarak D bölgeleri de barındırırlar. İlk olarak D ve J bölgeleri birleşir. Daha sonra bir V parçası yeniden düzenlenmiş DJ bölgesine eklenir. J ve C arasındaki intronlar kesip-ekleme (*splicing*) ile uzaklaştırılarak ağır zincir mRNA'sı elde edilir.

zincir V bölgesi, 12 D bölgesi, ve 4 J bölgesi vardır, buna göre, rekombinasyon ile oluşabilecek ağır zincir çeşidi sayısı 7200 (150x12x4)'dür.

Bölgeye özgül rekombinasyon ile oluşmuş 600 değişik hafif zincir ve 7200 değişik ağır zincirin oluşturacağı kombinasyonlarla yaklaşık $4x10^6$ değişik immünglobulin molekülü oluşturulabilir. İmmünglobulin gen parçalarının bağlanmasında sıklıkla bir ya da birkaç nükleotidin kazancı veya kaybı ile bu çeşitlilik daha da artmaktadır. Bu delesyon ve eklenmelerden kaynaklanan mutasyonlar immünglobulin değişken bölgelerin çeşitliliğini, yaklaşık 10^5 farklı hafif zincir ve 10^6 farklı ağır zincirin oluşumuna karşılık gelecek şekilde, yüz kattan daha fazla artırmaktadır. Bunların kombinasyonu ile 10^{11}'den daha fazla farklı antikor oluşabilecektir.

T hücre reseptörleri de benzer şekilde, her biri sabit ve değişken bölgeler içeren iki zincirden (*α ve β* olarak adlandırılır) oluşmuştur (**Şekil 7.36**). Bu polipeptidleri kodlayan genler, immünglobulin genlerinin oluşumuna benzer bir biçimde V ve J bölgeleri (*α* zincir) veya V, D ve J bölgeleri (*β* zincir) arasında rekombinasyonla oluşur. DNA'nın bu farklı bölgeleri arasındaki bölgeye özgül rekombinasyon ve rekombinasyon sürecinde oluşan mutasyonlar, immünglobulinlerdekine benzer biçimde, T hücre reseptörlerinde çeşitliliğin derecesini belirler.

V(D)J rekombinasyonu, özgül olarak lenfositlerde eksprese olan, RAG1 ve RAG2 olarak adlandırılan iki proteinin oluşturduğu kompleks aracılığıyla gerçekleşir. RAG proteinleri her gen bölgesinin kodlayıcı dizilerine komşu rekombinasyon sinyal dizilerini (RS) tanır ve kodlayan diziler ile RS dizileri



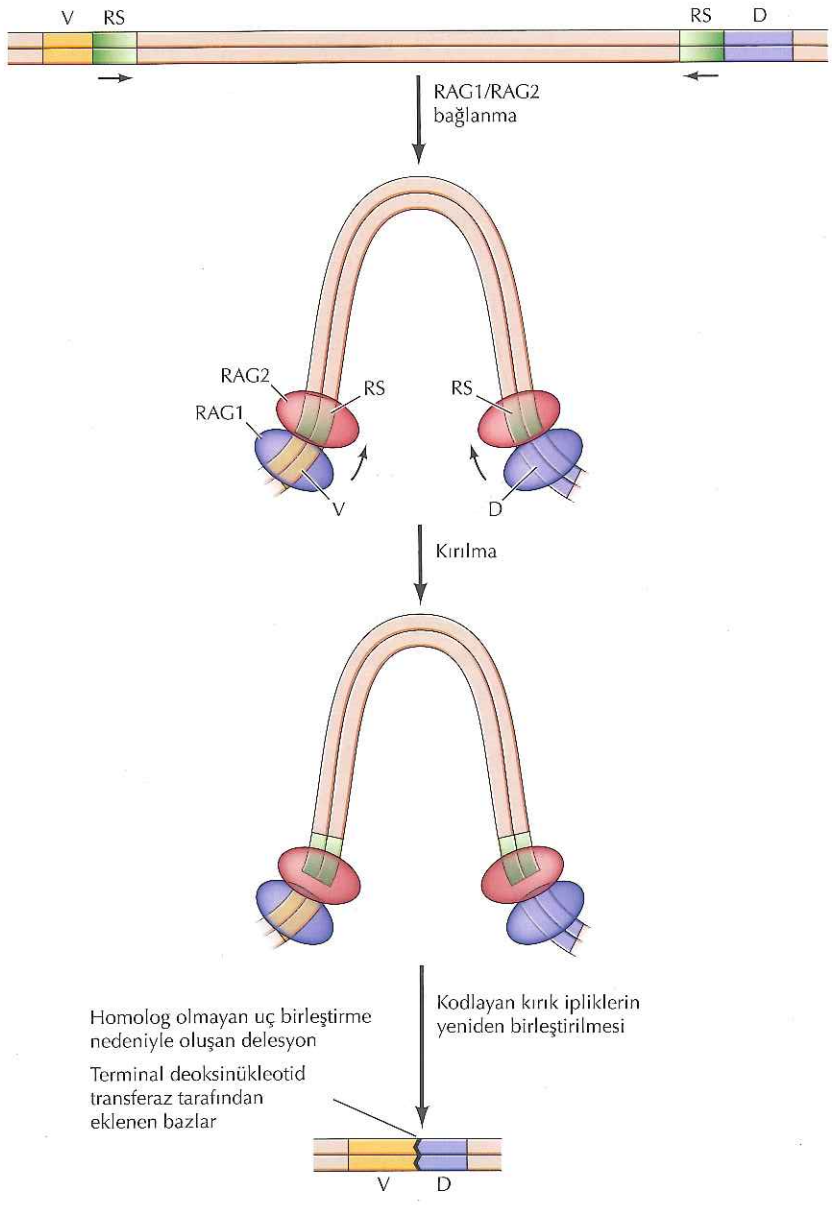
Şekil 7.36 T hücre reseptörünün yapısı T hücre reseptörleri plazma zarını kateden, disülfit bağlarıyla bağlı iki polipeptid zincirinden (*α* ve *β*) oluşur, *α* ve *β* zincirlerinin her ikisi de değişken ve sabit bölgelerden oluşmuştur.

Bilgi İçin

RAG1 ve RAG2 genlerindeki mutasyonlar şiddetli kombine bağışıklık yetmezliğine (severe combined immunodeficiency: SCID) neden olmaktadır. Bu hastalar fonksiyonel olmayan bir bağışıklık sistemi ile doğarlar ve eğer tedavi olmazlarsa ölümcül enfeksiyonlar geliştirirler. Tedaviler arasında, mikrop olmayan ortamda (plastik balon içinde) yaşamak, fonksiyonel bağışıklık sistemini oluşturan kök hücrelerin nakli ve gen terapisi yer almaktadır (Bkz. Bölüm 18).

arasında çift iplik kırıkları oluşturarak, DNA yeniden düzenlenmelerini başlatır (Şekil 7.37). Gen bölümlerinin kodlayan uçları daha sonra bir yeniden düzenlenmiş immünglobulin veya T hücre reseptör genini oluşturacak şekilde birleşirler. Bu çift iplik kırıkları homolog olmayan uç birleştirme işlemiyle birleştiğinden (bkz. Şekil 7.28) birleşme reaksiyonu sıklıkla nükleotid kaybına neden olur. Buna ilaveten, lenfositler DNA moleküllerinin uçlarına rastgele nükleotid ekleyen özel bir enzim (terminal deoksinükleotidil transferaz) içerirler, bundan dolayı birleşme reaksiyonu esnasında hem nükleotid kaybı, hem de kazanımı ile sonuçlanan mutasyonlar oluşur. Yukarıda belirtildiği üzere, bu mutasyonlar immünglobilinlerin ve T hücresi reseptörlerinin çeşitliliğine büyük oranda katkı sağlar.

Yeniden düzenlenmiş immünglobulin genlerinde antikor çeşitliliğinin daha da fazla oluşturulması yanızca B lenfositlerde olan iki işlemle gerçekleşir:

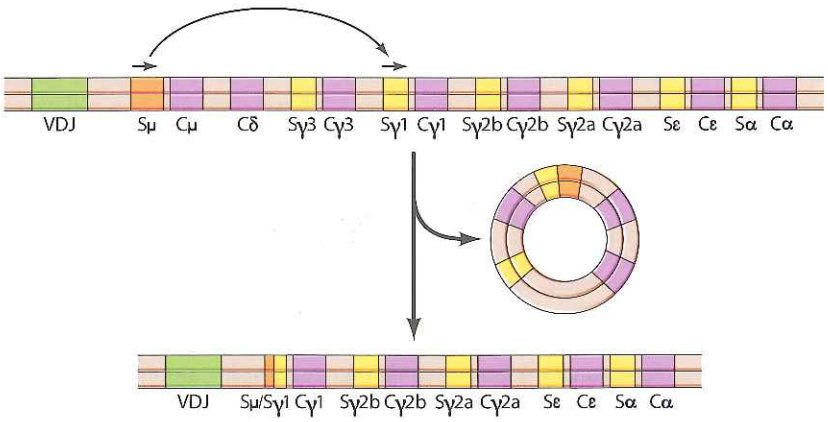


Şekil 7.37 V(D)J rekombinasyonu İmmünglobulin ve T hücre reseptör genlerini (örn. V ve D segmentleri) kodlayan sekansların 5′ ve 3′ uçları zıt oryantasyonda bulunan kısa rekombinasyonel sinyal (RS) sekansları ile çevrilidir. RS sekansları, DNA'yı, kodlayan sekans ve RS sekansı arasından kesen RAG1 ve RAG2, lenfositlere özgül rekombinasyon kompleksi tarafından tanınır. Gen segmentlerinin yeniden düzenlenmesi için kırılan kodlayan sekanslar tekrar birleştirilirler. Homolog olmayan uç birleşmesi esnasında uçlardaki bazların kaybedilmesinin yanı sıra, terminal deoksinükleotidil transferazın uçlara baz eklemesi mutasyonlara neden olur.

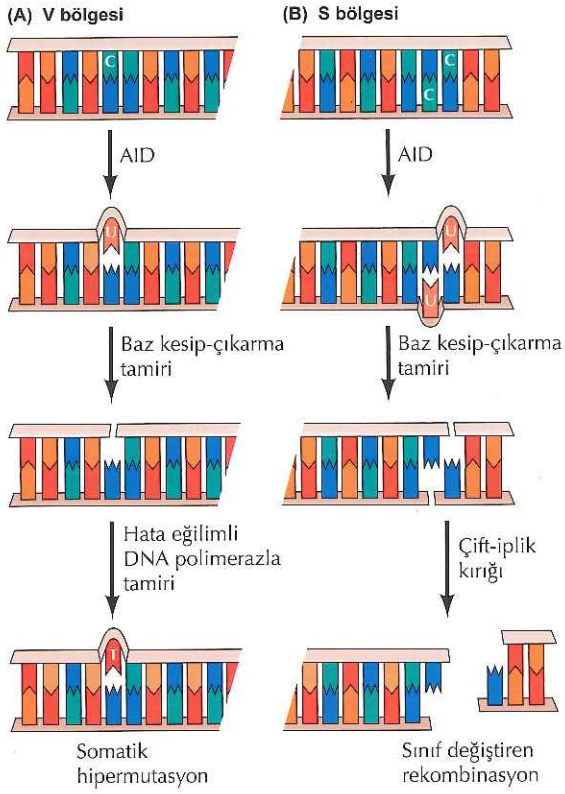
sınıf değiştirme rekombinasyonu ve somatik hipermutasyon. **Sınıf değiştirme (*switch*) rekombinasyonu,** yeniden düzenlenmiş V(D)J bölgelerinin farklı ağır zincirlerin sabit bölgeleri ile birleşmesi sonucunda, immün yanıtta farklı fonksiyonlara sahip antikorların oluşmasını sağlar. Memelilerde sabit kısımlar tarafından kodlanan zincirlerin, sabit kısımlar olan Cμ, Cγ, Cε ve Cα ile birleşmesi sırasıyla dört farklı sınıf immünglobulin –IgM, IgG, IgE ve IgA üretir. Buna ilaveten, IgG'nin farklı Cγ bölgeleri tarafından kodlanan birkaç alt sınıfı da vardır. Farklı sınıf immünglobulinler farklı antijenleri ortadan kaldırmak için farklı yollarla özelleşmişlerdir. IgM kompleman sistemini (istilacı hücre ve virüsleri yok eden bir grup serum proteini) aktive ettiği için, IgM antikorları bakteri ya da virüs enfeksiyonlarında ilk etkili ön savunmadır. Serumda en çok bulunan immünglobulin olan IgG antikorları, yalnızca kompleman sistemini aktive etmekle kalmayıp fagositik hücre reseptörlerine de bağlanırlar. IgG antikorları annenin dolaşımından plasentayı geçip fetusa immün koruma sağlar. IgA antikorları istilacı bakteri ve virüslere bağlanıp enfeksiyonu ortadan kaldıracakları, burun mukusu ve tükürük gibi farklı vücut sıvılarına salgılanırlar. IgA antikorları aynı zamanda emziren annelerde süte de salgılandıklarından, yeni doğanlara immün koruma sağlarlar. IgE antikorları parazitik enfeksiyonlara karşı korunmada etkilidir ve aynı zamanda alerjilerden sorumlu antikor sınıfıdır.

Başta V(D)J yeniden düzenlemesi ile oluşan değişken bölge Cμ ile birleşerek IgM antikorlarını oluşturur. Daha sonra sınıf değiştirme rekombinasyonu ile yeniden düzenlenmiş değişken kısmı, aradaki DNA'nın delesyonu ile aşağı yöndeki yeni bir sabit bölgeye transfer eder (**Şekil 7.38**). C bölgesinin hemen yukarısında bulunan şalter (*switch-S*) bölgesinde bulunan yüksek tekrar sayısına sahip diziler arasında rekombinasyon olur. Şalter bölgeleri 2-10 kb uzunluğunda olup rekombinasyon bu bölgelerin herhangi bir kısmında olabildiğinden, sınıf atlamasının, bir 'yere özel rekombinasyon' olayından ziyade 'bölgeye özel rekombinasyon' olayı olarak tanımlanması daha uygundur. Şalter bölgelerinin intronların içerisinde olmasından dolayı, sınıf değiştirme rekombinasyonunun kesin yeri immünglobin kodlama sekansını etkilemez.

Somatik hipermutasyonlar ağır ve hafif zincirlerin yeniden düzenlenmiş değişken bölgelerinde çoklu mutasyonlar oluşturarak immünglobinlerin çeşitliliğini artırırlar. Bu mutasyonlar, genelde tek baz değişiklikleridir ve görülme sıklıkları 10^{-3} kadardır bu da diğer kendiliğinden olan mutasyon frekansından yaklaşık bir milyon kez daha fazladır. Somatik mutasyonlar



Şekil 7.38 Sınıf değiştirme rekombinasyonu Sınıf değiştirme ağır zincir lokusunda (şekilde fare lokusu gösterilmektedir) bulunan bir seri sabit bölgenin (*constant, C*) yukarı yönünde bulunan tekrarlı şalter (S) bölgeleri arasında olan rekombinasyonla gerçekleşir. Örnekte, bir V(D)J bölgesi, *Sμ* ve *Sγ1* şalter bölgesi arasındaki rekombinasyon ile, *Cμ*'den *Cγ1*'ye transfer edilir. Arada kalan DNA halkasal bir molekül olarak dışarıya çıkartılır.



Şekil 7.39 AID'in somatik hipermutasyon ve sınıf değiştirme rekombinasyonundaki rolü Aktivasyonla indüklenmiş deaminaz (AID) enzimi DNA'da C'den amino grubunu çıkararak U'ya dönüştürür. U'nun baz çıkarma ile ortadan kaldırılması (bkz. Şekil 7.21) DNA'da tek iplik boşluğu oluşturur. (A) Değişken (*variable, V*) bölgelerde tamir esnasında oluşan hatalar, muhtemelen özelleşmiş hataya-eğilimli DNA polimerazdan (bkz. Şekil 7.27) dolayı, somatik hipermutasyonlara neden olur. (B) Şalter bölgelerinde (Switch,S) karşı iplikte bulunan bazların kesip çıkartılması sınıf değiştirmeyi tetikleyen çift iplik kırıklarına neden olabilir.

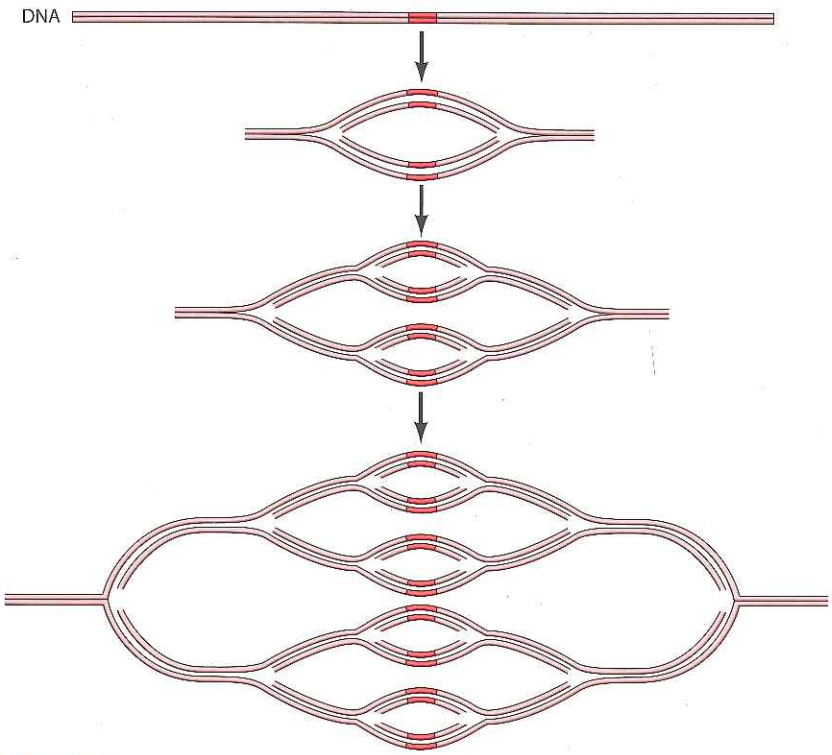
immünglobinlerin antijenlerine karşı belirgin bir şekilde afinitelerini artırtırarak bağışıklık sisteminin etkinliğine önemli katkı sağlarlar.

Sınıf değiştirme rekombinasyonu ve somatik hipermutasyon, programlaşmış genetik değişikliklerinin yeni bulunmuş tipleri olup, ilişkili moleküler mekanizmalar oldukça aktif araştırma alanlarındandır. İki olayda da ana oyuncu 1999 yılında Tasuku Honjo ve çalışma arkadaşları tarafından bulunan ve **aktivasyonla indüklenmiş deaminaz (AID)** olarak adlandırılan enzimdir. AID yalnızca B lenfositlerde üretilir ve hem sınıf değiştirme rekombinasyonu hem de somatik hipermutasyonu için gereklidir. AID DNA'daki sitozinin deminasyonunu katalizleyerek urasil oluşturur. (Şekil 7.39). Enzim aktivitesi immünglobin genlerinin değişken kısımları ve şalter kısımlarında C'nin U'ya (C→U) dönüşmesi ile sonuçlandığından, sırasıyla somatik hipermutasyona ve sınıf değiştirme rekombinasyonuna neden olur. C→U mutasyonlarının bu olayları nasıl tetiklediği tam olarak anlaşılmamış olmakla beraber, U'nun baz kesip-çıkartma tamiri (bkz. Şekil 7.21) ile kaldırılması önemli bir adım olarak gözükmektedir. Şalter bölgelerinde (oldukça yüksek miktarda GC baz çiftlerine sahiptirler) karşıt ipliklerdeki Urasilin çıkarılması çift iplik kırıklarının oluşmasına neden olur. Daha sonra farklı şalter bölgelerindeki kırıkların homolog olmayan uç birleşmesi ile tekrar bir araya gelmesi sınıf değiştirme rekombinasyonu ile sonuçlanır (bkz. Şekil 7.28). Değişken bölgelerde, somatik hiper mutasyonların sebebinin, C→U mutasyonlarının tamirindeki yüksek hata sıklığının, muhtemelen hataya-eğilimli (*error-prone*) özelleşmiş DNA polimerazlar tarafından tamir edilmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (bkz. Şekil 7.27). Bu süreçlerdeki detayların hala açıklığa kavuşturulması gerekirken, AID'in gelişimin belli bir safhasında DNA'da mutasyon oluşturan oldukça ilginç bir enzim olduğu oldukça açıkdır.

Gen amplifikasyonu

Şu ana kadar tartışılmış olan DNA yeniden düzenlenmeleri genomda bir DNA dizisinin konumunu değiştirmektedir. Hücre içerisinde bir genin kopya sayısını artıran **gen amplifikasyonu**, genom yapısındaki farklı tipte bir değişim olarak değerlendirilebilir. Gen amplifikasyonları, belirli bir bölgenin çok sayıda kopyasını üreten, tekrarlayan DNA replikasyon döngülerinin sonucudur (Şekil 7.40). Amplifiye olmuş DNA dizileri, kromozom dışı serbest moleküller olarak bulunabildikleri gibi, bir kromozom içerisinde ardışık sıralı dizinler olarak da bulunabilirler. Her iki durumda da, transkripsiyon için genin çok sayıda kopyası bulunduğundan, sonuç olarak amplifiye olan genin ekspresyonu artar.

Gen amplifikasyonu bazen, gelişim sırasındaki programlanmış gen ekspresyon artışından sorumludur. Prototip örnek, amfibi oositlerinde (döllenmemiş yumurtalar) ribozomal RNA genlerinin amplifikasyonudur. Yumurtalar oldukça büyük hücrelerdir ve buna uygun olarak yüksek oranda



Şekil 7.40 DNA Amplifikasyonu DNA replikasyonunun tekrarlayan döngüleri sonucunda, belli bir kromozom bölgesinin bölgesinden çoklu kopyaları oluşturur.

protein sentezi gereksinimleri vardır. Özellikle amfibi oositleri hacim olarak, tipik bir somatik hücreden yaklaşık bir milyon kez daha büyüktür ve erken gelişim sürecinde büyük miktarlarda proteinin sentezini sağlamak zorundadırlar. Bunun için, ribozomal RNA sentezinin artması gerekir ki, bu da kısmen ribozomal RNA genlerinin amplifikasyonu ile sağlanır. Halihazırda her genomda yaklaşık birkaç yüz ribozomal RNA gen kopyası bulunur. Böylece, somatik hücrelerin gereksinimlerini karşılayacak kadar yeterli ribozomal RNA üretilebilir. Amfibi yumurtalarında bu genler, her oositte yaklaşık bir milyon kopya olacak şekilde, iki bin kez daha amplifiye olur. Bir diğer programlanmış gen amplifikasyonu örneği *Drosophila*'da görülür. Burada, yumurta kabuğunun proteinlerini kodlayan genler (koriyon genleri), over hücrelerinde, bu proteinin yüksek miktarda elde edilmesini sağlamak için amplifiye olurlar. Diğer programlanmış gen yeniden düzenlenmeleri gibi gen amplifikasyonu da, sadece ileri derecede özelleşmiş hücrelerde nadir olarak gerçekleşen bir olaydır, gen yeniden düzenlenmesinin genel bir mekanizması değildir.

Gen amplifikasyonları, kanser hücrelerinde anormal bir olay olarak da meydana gelir ve kontrolsüz hücre çoğalmasıyla sonuçlanan artmış gen ekspresyonlarına neden olur. Ayrıca, kanser hücrelerinde gen amplifikasyonu, hücreleri çoğalmaya sürükleyen genlerin (onkogen) ekspresyonlarının artmasına neden olarak, doğrudan tümör gelişimine yol açar (bkz. Bölüm 19). Bu nedenle, diğer tip DNA yeniden düzenlenmelerinde olduğu gibi, gen amplifikasyonunun da oluştuğu hücre veya organizma için yararlı ya da zararlı etkileri olabilir.

ÖZET

DNA Replikasyonu

- ***DNA polimerazlar:*** Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin her ikisinde de değişik DNA polimerazlar, DNA replikasyonu ve tamirinde farklı roller üstlenirler. Bilinen bütün DNA polimerazlar, DNA sentezini önceden sentezlenmiş primer DNA ipliğine deoksinükleotid trifosfatları (dNTP'ler) yalnızca 5′ den 3′ yönünde ekleyerek gerçekleştirirler. Bkz. **Video 7.1.**

- ***Replikasyon çatalı:*** DNA'nın atasal iplikleri ayrılır ve replikasyon çatalında iki yeni ipliğin sentezi için kalıp olurlar. Bir yeni DNA ipliği (öncü iplik) sürekli biçimde sentezlenir, diğer iplik (aksak iplik) replikasyonun genel yönlenimine ters olarak sentezlenen küçük DNA fragmanlarının birleşmesiyle sentezlenir. DNA polimerazlar ve diğer birçok protein DNA'nın aksak ve öncü ipliklerinin sentezinde birlikte hareket ederler. Bkz. **Animasyon 7.1.**

- ***Replikasyonun doğruluğu:*** DNA polimerazlar , hem eklenecek doğru bazı seçerek hem de sentezlenen iplikteki hataları düzeltme (*proofreading*) özellikleriyle, hatalı eşleşmiş bazları uzaklaştırarak replikasyonun doğruluğunu artırırlar.

- ***Başlangıç noktaları (orijinler) ve replikasyonun başlaması:*** DNA replikasyonu, süreci başlatacak proteinler için bağlanma bölgelerini içeren, spesifik replikasyon orijinlerinden başlar. İleri ökaryotlarda, orijinler DNA sekansından ziyade kromatin yapısı ile belirlenir.

- ***Telomerler ve telomeraz: kromozom uçlarının replikasyonu:*** Kromozomların uçlarındaki telomerik tekrar dizileri, kendi kalıp RNA'sını taşıyan bir revers transkriptaz (telomeraz) tarafından sentezlenir.

DNA Tamiri

- ***DNA hasarının doğrudan geri döndürülmesi:*** Pirimidin dimerleri ve alkillenmiş guanin gibi bazı genel DNA hasar tipleri, hasarın doğrudan geri döndürülmesi ile tamir edilir.

- ***Kesip-çıkarma tamiri:*** Birçok DNA hasar çeşidi, hasarlı DNA'nın kesilip çıkarılmasıyla onarılır. Oluşan boşluk, hasar içermeyen tamamlayıcı ipliğin kalıp olarak kullanılmasıyla sentezlenen yeni DNA ile kapatılır. Baz kesip-çıkarma tamirinde, tek hasarlı bazların özel tipleri DNA molekülünden çıkarılır. Bunun aksine nükleotid kesip-çıkarma tamir sistemleri DNA yapısını bozan çok çeşitli lezyonları tanır ve hasarlı bazlar bir oligonükleotidin parçası olarak uzaklaştırılır. Üçüncü tip kesip-çıkarma tamir sistemi yeni sentezlenmiş DNA'dan hatalı eşleşmiş bazları spesifik olarak çıkarır. Bkz. **Video 7.2.**

- ***Translezyon DNA sentezi:*** Özelleşmiş bazı DNA polimerazlar DNA'nın hasarlı olduğu bölgedeki DNA'yı replike edebilirler, ancak, polimerazların bu özelliği yüksek sıklıkta hatalı baz eklenmesine neden olabilir.

- ***Çift iplik kırıklarının tamiri:*** Çift iplik kırıkları hasarlı ipliklerin rekombinasyon ile tekrar birleşmesini sağlar. Rekombinasyonel tamir ya hasarlı olmayan kromozomların homolog rekombinasyon ile ya da tek DNA molekülünün kırık uçlarının homolog olmayan tekrar birleşmesi ile gerçekleşebilir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

DNA polimeraz

replikasyon çatalı, Okazaki fragmanları, DNA ligaz, öncü iplik, aksak iplik, primaz, RNaz H, ekzonükleaz, helikaz, tek iplik DNA'ya bağlanan proteinler, topoizomerazlar

hata düzeltme

replikasyon orijini, bağımsız replike olan diziler (ARS), orijin tanıma kompleksi (ORC)

telomer, telomeraz, revers transkriptaz

pirimidin dimeri, fotoreaktivasyon

baz kesip-çıkarma tamiri, DNA glikozilaz, AP endonükleaz, nükleotid kesip-çıkarma tamiri, ekzinükleaz, transkripsiyon-eşlikli tamir, hatalı-eşleşme tamiri

translezyon DNA sentezi

çift-iplik kırığı, rekombinasyonel tamir, homolog rekombinasyon, RecA, Rad51

ÖZET

DNA Yeniden Düzenlenmeleri

- ***Maya eşleşme tipleri:*** Maya eşleşme tipler arasındaki değişim, eşleşme tipi lokusundaki aktif ve inaktif alleller arasındaki bölgeye özgü rekombinasyonla sağlanır.
- ***Antikor genleri:*** Omurgalılarda, bağışıklık sisteminin gelişimi esnasında immünglobulin ve T hücre reseptörü genlerinin oluşturulmasında bölgeye özgül rekombinasyonunun kritik bir rolü vardır. Somatik hipermutasyon ve sınıf değiştirme rekombinasyonu ile immünglobulin genlerinde ilave çeşitlilik sağlanır. Bkz. **Animasyonlar 7.2** ve **7.3.**
- ***Gen amplifikasyonu:*** Gen amplifikasyonları bir kromozomal bölgenin tekrarlayan replikasyonunun sonucudur. Bazı durumlarda gen amplifikasyonu, gelişim esnasında gen ekspresyonunu artırmak için bir mekanizma oluşturur. Gen amplifikasyonları, kanser hücrelerinde sıklıkla görülür ve kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olan artmış gen ekspresyonlarıyla kendini gösterir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

bölgeye özgül rekombinasyon

antijen, immünglobulin, T hücre reseptörü, sınıf değiştirme rekombinasyonu, somatik hipermutasyon, aktivasyonla indüklenen deaminaz (AID)

gen amplifikasyonu

Sorular

1. DNA polimeraz I'de bir mutasyon taşıyan sıcaklığa-duyarlı bir *E. coli* susuşu izole ettiniz. Bu mutasyonu taşıyan bakteride, yüksek sıcaklıklarda hangi bozuklukları (eğer varsa) gözlemlersiniz?
2. Topoizomeraz I ve II'nin etkinliklerini kıyaslayınız.
3. Maya genomunun replikasyonu esnasında sentezlenen Okazaki parçalarının sayısı yaklaşık kaçtır?
4. Okazaki fragmanlarının sentezi DNA polimeraz yerine neden primaz tarafından başlatılır?
5. DNA polimerazda 3′den 5′de ekzonükleaz aktivitesinin fonksiyonu nedir? DNA polimeraz III'ün aktivitesinin mutasyona uğramasının *E. coli* DNA'sının doğru replikasyonu üzerindeki sonuçları ne olur?
6. Bir maya hücresindeki bir DNA dizisinin replikasyon başlangıç noktasını içerip içermediğini nasıl test edersiniz?
7. Maya hücreleri genomlarını tamamen replike etmek için telomeraza ihtiyaç duyarken *E. coli*'nin bu özel enzime ihtiyacı yoktur. Neden?
8. Bir hücre DNA'sındaki çift iplik kırıkların tamirinde hangi mekanizmayı kullanır? Bunun tek iplik kırıklarının tamirinden farkı nedir?
9. Xeroderma pigmentosum hastalarında oldukça yüksek sıklıkla deri kanseri görülmekle beraber iç organ kanserleri görülmez (örn., kolon kanseri). Bu, çoğu iç organ kanserinden sorumlu olan DNA hasarlarının çeşitleri hakkında neyi gösterir?
10. Klinikte AIDS'in tedavisi için kullanılan ilaçların çoğu HIV reverz transkriptörlerin inhibitörleridir. Bu inhibitörlerden başka hangi hücresel olaylar etkilenebilir?
11. İnsanlardaki hatalı-eşleşme tamir sistemi *E. coli*'nin *MutS* ve *MutL* homologlarını içerirken *MutH*'ı içermez. Neden?
12. Lenfositlerde bölgeye özgül rekombinasyon için gerekli bir genden yoksun olan mutant bir farenin fenotipinin nasıl olmasını beklersiniz?

Atıf

Hücre
Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar (Her ana bölüm için en önemli anahtar derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

DNA Replikasyonu

Annunziato, A. T. 2005. Split decision: What happens to nucleosomes during DNA replication? *J. Biol. Chem.* 280: 12065-12068. [R]

Armanios, M. and E. H. Blackburn. 2012. The telomere syndromes. *Nature Rev. Genet.* 13: 693-704. [R]

Bell, S. P. and A. Dutta. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Ann. Rev. Biochem.* 71: 333-374. [R]

Bernandes de Jesus, B. and M. A. Blasco. 2013. Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet.* 29: 513-520.[R]

Cozzarelli, N. R., G. J. Cost, M. Nollmann, T. Uiard and J. E. Stray. 2006. Giant proteins that move DNA: bullies of the genomic playground . *Nature Mol. Cell Biol.* 7: 580-588. [R]

Frick, D. N. and C. C. Richardson. 2001. DNA primases. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 39-80. [R]

Gilbert, D. M. 2004. Insearch of the holy replicator. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 1-8. [R]

Greider, C. W. and E. H. Blackburn. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405-413. [P]

Horn, S., A. Figl, P. S. Rachakonda, C. Fischer, A. Sucker, A. Cast, S. Kadel, I. Moll, E. Nagore, K. Hemminki, D. Schadendorf and R. Kumar. 2013. *TERT* promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 339: 959-961. [P]

Huang, F. W., E. Hodis, M. J. Xu, G. V. Kryukov, L. Chin and L. A. Garraway. 2013. Highly recurrent *TERT* promoter mutations in human melanoma. *Science* 339: 957-959. [P]

Huberman, J. A. and A. D. Riggs. 1968. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J. Mol. Biol.* 32: 327-341. [P]

Johnson, A. and M. O'Donnell. 2005. Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Ann. Rev. Biochem.* 74: 283-315. [R]

Kornberg, A. 2000.Ten commandments: lessons from the enzymology of DNA replication. *J. Bacterial.* 182: 3613-3618 [R]

Machida, Y. J., J. L. Hamlin and A. Dutta. 2005. Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* 123: 13-24. [R]

McCulloch, S. D. and T. A. Kunkel. 2008. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res.* 18: 148-161. [R]

Mechali, M. 2010. Eukaryotic DNA replication origin: many choices for appropriate answers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 728-738. [R]

Moldovan, G.-L., B. Pfander and S. Jentsch. 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129: 665-679. [R]

Nitiss, J. L. 2009. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Rev. Cancer* 9: 327-337. [R]

Robinson, N. P. and S. D. Bell. 2005. Origins of DNA replication in the three domains of life. *FEBS J.* 272: 3757-3766. [R]

Stillman, B. 2008. DNA polymerases at the replication fork in eukaryotes. *Mol. Cell* 30: 259-260. [R]

Stinthcomb, D. T., K. Struhl and R. W. Davis. 1979. Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282: 39-43. [P]

DNA Tamiri

Cleaver, J. E. 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* 218: 652-656. [P]

David, S. S., V. L. O'Shea and S. Kundu. 2007. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447: 941-950. [R]

Essen, L. O. and T. Klar. 2006. Light-driven DNA repair by photolyases. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 1266-1277. [R]

Fishel, R., M. K. Lescoe, M. R. S. Rao, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. Garber, M. Kane and R. Kolodner. 1993. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027-1038. [P]

Friedberg, E. C., A. R. Lehmann and R. P. P. Fuchs. 2005. Trading places: How do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol. Cell* 18: 499-505. [R]

Friedberg , E . C., G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz and T. Ellenberger. 2005. *DNA Repair and Mutagenesis.* Washington, D.C.: ASM Press.

Hanawalt, P. C. and G. Spivak. 2008. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 958-970. [R]

Hegde, M. L., T. K. Hazra and S. Mitra. 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* 18: 27-47. [R]

Jensen, R. B., A. Carreira and S. C. Kowalczykowski. 2010. Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* 467: 678-683. [P]

Jiricny, J. 2006. The multifaceted mismatch repair system. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 335-346. [R]

Leach, F. S. and 34 others. 1993. Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75: 1215-1225. [P]

Lehmann, A. R., A. Niimi, T. Ogi, S. Brown, S. Sabbioneda, J. F. Wing, P. L. Kannouche and C. M. Green.

2007. Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair* 6: 891-899. [R]

Lieber, M. R. 2008. The mechanism of human nonhomo logous DNA end joining. *J. Biol. Chem.* 283: 1-5. [R]

Marteijn, J. A., H. Lans, W. Vermeulen and J. H. Hoeijmakers. 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 465-481. [R]

Mimitou, E. P. and L. S. Symington. 2009 . Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem. Sci.* 34: 264-272. [R]

Pena-Diaz, J. and J. Jiricny. 2012. Mammalian mismatch repair: error-free or errorprone? *Trends Biochem. Sci.* 37: 206-214. [R]

San Filippo, J., P. Sung and H. Klein. 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 77: 9.1-9.29. [R]

Savery, N. J. 2007. The molecular mechanism of transcription-coupled DNA repair. *Trends Microbial.* 15: 326-333. [R]

Sedgwick, B., P. A. Bates, J. Paik, S. C. Jacobs and T. Lindahl. 2007. Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair* 6: 429-442. [R]

Thorlund, T. and S. C. West. 2007. BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene* 26: 7720-7730. [R]

Yang, W. and R. Woodgate. 2007. What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 15591-15598. [R]

DNA Yeniden Düzenlenmesi

Chaudhuri, J. and F. W. Alt. 2004. Classswitch recombination: Interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nature Rev. Immunol.* 4: 541-552. [R]

Claycomb, J. M. and T. L. Orr-Weaver. 2005. Developmental gene amplification: Insights into DNA replication and gene expression. *Trends Genet.* 21: 149-162. [R]

Di Noia, J. M. and M. S. Neuberger. 2007. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 1-22. [R]

Haber, J. E. 2012. Mating-type genes and *MAT* switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191: 33-64. [R]

Honjo, T., H. Nagaoka, R. Shinkura and M. Muramatsu. 2005. AID to overcome the limitations of genomic information. *Nature Immunol.* 6: 655-661. [R]

Hozumi, N. and S. Tonegawa. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3628-3632. [P]

Jung, D. and F. W. Alt. 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Ann. Rev. Immunol.* 24:541-570. [R]

Maizels, N. 2005. Immunoglobulin gene diversification. *Ann. Rev. Genet.* 39: 23-46. [R]

Maul, R. W. and P. J. Gearhart. 2010. AID and somatic hypermutation. *Adv. Immunol.* 105: 159-191. [R]

Schatz, D. G. and Y. Ji. 2011. Recombination centres and the orchestration of V [D] J recombination. *Nature Rev. Immunol.* 11: 251-263. [R]

Teng, G. and F. N. Papavasiliou. 2007. Immunoglobulin somatic hypermutation. *Ann. Rev. Genet .* 41: 107-120. [R]

Tower, J. 2004. Developmental gene amplification and origin regulation. *Ann. Rev. Genet.* 38: 273-304. [R]

BÖLÜM 8

RNA Sentezi ve İşlenmesi

Bakterilerde Transkripsiyon 259

Ökaryotik RNA Polimerazlar ve Genel Transkripsiyon Faktörleri 265

Ökaryotlarda Transkripsiyonun Düzenlenmesi 271

Kromatin ve Epigenetik 284

RNA İşlenmesi ve Dönüşümü 295

Anahtar Deney
Bir Ökaryotik Transkripsiyon Faktörünün İzolasyonu 279

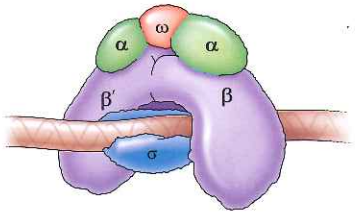
Anahtar Deney
snRNP' lerin Keşfi 303

Bölüm 6 ve 7'de tüm hücresel fonksiyonları yöneten genetik komutların toplamı olarak değerlendirilebilecek genomik DNA'nın organizasyonu ve korunması ele alındı. Bu komutlar RNA ve protein sentezi yoluyla uygulanmaktadır. Burada önemli olan, hücre davranışının sadece hangi genlerin kalıtıldığına göre değil, aynı zamanda belirli bir zaman aralığında bu genlerinin hangilerinin eksprese edildiklerine göre belirlenmesidir. Gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücrelere içinde bulundukları çevresel koşullardaki değişikliklere uyum sağlamaları için olanak verir ve kompleks bitki ve hayvanları oluşturan çeşitli farklılaşmış hücre tiplerine özgü belirgin aktivitelerden sorumludur. Çok hücreli organizmalardaki hücrelerin neredeyse tamamı aynı genomik DNA'ya sahiptir. Örneğin, kas ve karaciğer hücreleri aynı genleri taşır. Bu hücrelerin işlevleri genomlarındaki farklılıklara göre değil, gelişim ve farklılaşmayı yöneten düzenlenmiş gen ekspresyon paternleri ile belirlenir.

Gen ekspresyonunun ilk basamağı olan DNA'nın RNA'ya transkripsiyonu, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin her ikisinde de gen ekspresyonunun düzenlendiği ilk aşamadır. Ökaryotik hücrelerdeki RNA'lar, ilk transkriptten işlevsel formlara dönüştürülmek üzere daha sonra çeşitli yollarla -örneğin, intronların kesip-ekleme (*splicing*) işlemi ile çıkarılması-değişikliğe uğrarlar. RNA'nın farklı tipleri hücrede belli roller oynar: Mesajcı RNA'lar (mRNA) protein sentezi için kalıp görevi görür, ribozomal RNA'lar (rRNA) ve taşıyıcı RNA'lar (tRNA) mRNA'nın proteine translasyonunda görev alır. Diğer kodlamayan RNA'lar, ökaryotlarda gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, mRNA kesilip eklenmesinde (kesip-ekleme), rRNA işlenmesinde ve proteinlerin tasnifinde görev yaparlar. Aslında, son yıllarda yaşanan en heyecan verici gelişmelerden biri, kodlamayan RNA'ların ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonunun düzenleyicileri olarak rol almalarına ilişkin olmuştur. Transkripsiyon ve RNA işlenmesi bu bölümde tartışılmaktadır. Gen ekspresyonun son basamağı olan mRNA'ların proteine çevrimi (translasyonu) Bölüm 9'un konusudur.

Bakterilerde Transkripsiyon

Moleküler biyolojinin pek çok alanında olduğu gibi, *E. coli* çalışmaları daha sonra ökaryotik hücrelerde yapılan transkripsiyon çalışmaları için bir model oluşturmuştur. Bölüm 4'de incelendiği gibi, mRNA ilk olarak *E. coli*'de keşfedilmiştir. *E. coli* aynı zamanda RNA polimerazın saflaştırıldığı ve çalışıldığı ilk organizmadır. Gen ekspresyonunun düzenlenmesi, *E. coli*'nin besin varlığındaki değişiklikler gibi çevresel koşullarda oluşan değişimlere uyum sağlamasına izin verir ve transkripsiyonu düzenleyen temel mekanizmalar da yine *E. coli'de* yapılan öncü deneylerle aydınlatılmıştır. Dolayısıyla *E. coli*'deki transkripsiyonun anlaşılması, ökaryotik hücrelerdeki gen ekspresyonunu düzenleyen çok daha karışık mekanizmaların çalışılması için temel sağlamıştır.



Şekil 8.1 ***E. coli*** **RNA polimerazı** Tam enzim altı alt birimden oluşur: iki α, bir β, bir β', bir ω ve bir σ. σ alt birimi göreceli olarak zayıf bir şekilde bağlıdır ve kor polimerazı oluşturan diğer beş alt birimden ayrılabilir.

Animasyon 8.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a8.1
Transkripsiyon Transkripsiyon RNA polimeraz enzimi tarafından katalizlenen DNA-güdümlü RNA sentezidir.

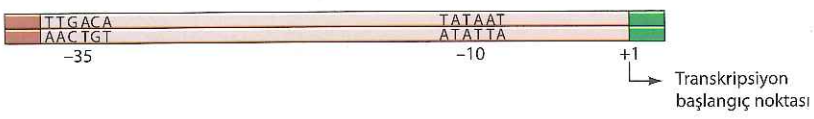
RNA polimeraz ve transkripsiyon

RNA sentezinden sorumlu başlıca enzim, bir DNA kalıbının yönlendirmesiyle ribonükleotid trifosfatların (NTP'ler) polimerizasyonunu katalizleyen **RNA polimerazdır**. RNA sentezi DNA'nınkine benzer. DNA polimeraz gibi RNA polimeraz da RNA zincirinin uzamasını daima 5′ den 3′ yönünde katalizler. DNA polimerazdan farklı olarak RNA polimeraz, RNA sentezinin başlaması için önceden oluşturulmuş bir primere gereksinim duymaz. Bunun yerine, transkripsiyon genlerin başlangıcındaki belirli özgün bölgelerde *de novo* olarak başlar. Başlangıç işlemi, transkripsiyonun düzenlendiği esas basamak olduğundan, özellikle önemlidir.

RNA polimeraz, DNA polimeraz gibi, çok sayıda polipeptid zincirinden oluşmuş kompleks bir enzimdir. Bakteriyel RNA polimerazın tamamı α, β, β', ω ve σ olarak isimlendirilen beş farklı tip alt birimden oluşur (**Şekil 8.1**). Sigma (σ) alt birimi göreceli olarak zayıf bir şekilde bağlıdır ve diğer alt birimlerden ayrıldığında, iki α, bir β, bir β' ve bir ω alt biriminden oluşan kor polimeraz ortaya çıkar. Kor polimeraz, NTP'lerin RNA'ya polimerleşmesini katalizleme yeteneğine sahiptir ve bu durum enzimin temel katalitik aktivitesi için σ alt ünitesine gerek duymadığını gösterir. Buna rağmen, kor polimeraz, transkripsiyonun normal başlangıç noktasını işaret eden DNA dizisine spesifik olarak bağlanamaz. Bu yüzden transkripsiyonun başlaması için doğru bölgenin tanınmasında σ alt birimi gereklidir. İşlevsel bir RNA'nın sentezi o genin başlangıç noktasından başlamak zorunda olduğu için, bu bölgelerin seçimi transkripsiyonun önemli bir unsurudur. *E. coli* dahil bakterilerin çoğu, farklı koşullar altında –örneğin, açlık koşulları veya bunun aksine besinin bol olarak bulunduğu koşullar gibi– RNA polimerazlarını farklı transkripsiyon başlangıç bölgelerine yönlendirebilen birbirinden farklı, çeşitli σ alt birimlerine sahiptir.

RNA polimerazın bir genin transkripsiyonunu başlatmak için bağlandığı DNA dizisine **promotör** denir. Promotör işlevi gören DNA dizisi, ilk olarak *E.coli*'den izole edilen farklı genlerin nükleotid dizilerinin karşılaştırılması ile tanımlanmıştır. Bu karşılaştırmalar, transkripsiyonun başlangıç noktasının yukarı yönündeki (5') bu bölgenin, pek çok gende birbirine benzer iki dizi seti içerdiğini ortaya çıkardı. Bu ortak dizilerin her biri altı nükleotid içermekte ve transkripsiyon başlangıç noktasının yaklaşık olarak 10 ve 35 baz çifti yukarısında bulunmaktadır (**Şekil 8.2**). Ortak diziler -10 ve -35 elemanları olarak adlandırılırlar ve bu onların +1 olarak tanımlanan transkripsiyon başlangıç noktasına olan göreceli konumlarını gösterir. Farklı promotörlerdeki -10 ve -35 konumundaki diziler tamamıyla aynı değildir. Ancak, bir konsensus (ortak) dizi oluşturmak için yeteri kadar benzerdirler –her bir pozisyon için o pozisyonda en sık görülen bazların toplamı konsensus diziyi oluşturur.

Birçok deneysel kanıt, -10 ve -35 promotör elemanlarının fonksiyonel önemini desteklemektedir. Birincisi, promotörleri konsensus dizilere kıyasla farklı olan genler, promotörleri konsensus dizilerle benzerlik gösteren genlere göre daha az verimlilikle transkripsiyona uğrar. Ayrıca, RNA polimerazın promotör üzerinde bağlandığı bölgelerin doğrudan analizi, polimerazın genellikle -40'dan +20'ye uzanan yaklaşık 60 baz çiftlik bir bölgeye (transkripsiyon başlangıç noktasının 40 nükleotid yukarısından 20 nükleotid aşağısına) bağlandığını göstermiştir. Sigma alt birimi, -35 ve -10 promotör bölgelerindeki dizilerin ikisine de spesifik olarak bağlanır ve bu durum bu dizilerin promotör fonksiyonundaki önemini doğrulamaktadır. Ayrıca, bazı *E. coli* promotörleri -35 bölgenin yukarısında bulunan üçüncü bir diziye



Şekil 8.2 ***E. coli*** **promotörlerinin dizileri** *E. coli* promotörleri, transkripsiyon başlangıç noktasının (+1) 10 ve 35 baz çifti yukarısında bulunan iki dizi seti ile karakterize edilirler. Şekilde gösterilen konsensus diziler, farklı promotörlerde en sık rastlanılan bazlara karşılık gelmektedir.

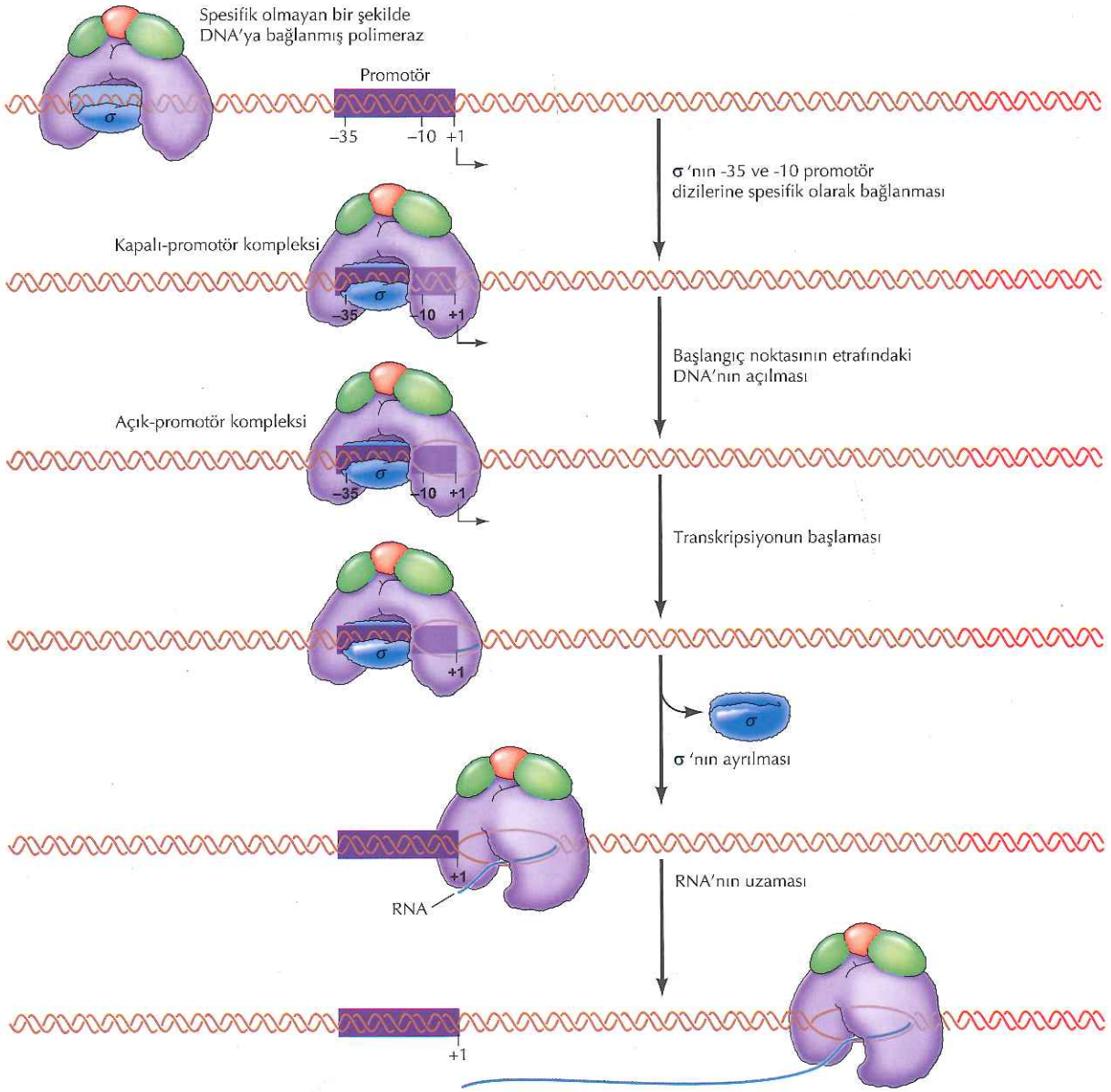
sahiptir ve bu dizi RNA polimeraz *a* alt birimi için spesifik bir bağlanma yeri olarak görev yapar.

Sigmanın yokluğunda, RNA polimeraz özgül olmayan bir şekilde ve düşük bir çekim kuvveti ile DNA'ya bağlanır. Sigmanın rolü, -35 ve -10 dizilerinin ikisine de spesifik olarak bağlanarak, polimerazı promotöre yönlendirmek ve transkripsiyonun başlangıcının genin başlarında olmasına öncülük etmektir (**Şekil 8.3**). Polimeraz ile promotör arasındaki ilk bağlanma, DNA henüz açılmamış

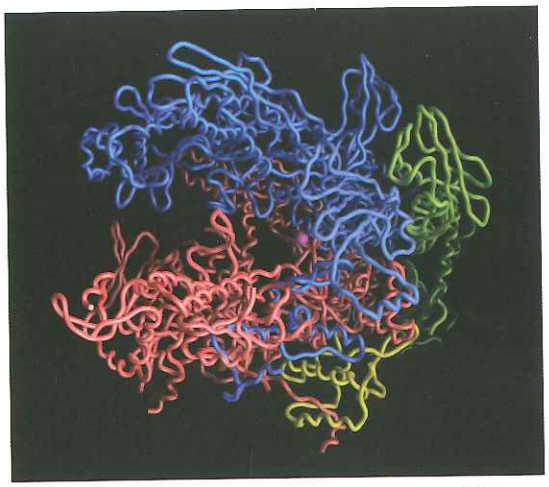
Video 8.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v8.1

DNA Transkripsiyonu Transkripsiyon esnasında DNA, RNA polimeraz tarafından okunur ve böylece komplementer (eşlenik) bir RNA ipliği üretilir.



Şekil 8.3 ***E. coli* RNA polimerazı ile transkripsiyon** Öncelikle polimeraz spesifik olmayan bir şekilde DNA'ya bağlanır ve σ alt birimi -35 ve -10 promotör elemanlarına bağlanıp kapalı-promotör kompleksini oluşturuncaya kadar molekül üzerinde ilerler. Polimeraz daha sonra başlangıç noktasının etrafında DNA zincirlerini açar ve açık-promotör kompleksini oluşturur. Serbest NTP'lerin polimerizasyonu ile transkripsiyon başlar. Daha sonra σ alt birimi kor polimerazdan ayrılır ve kor polimeraz DNA üzerinde ilerleyerek RNA zincirinin uzamasını sağlar.

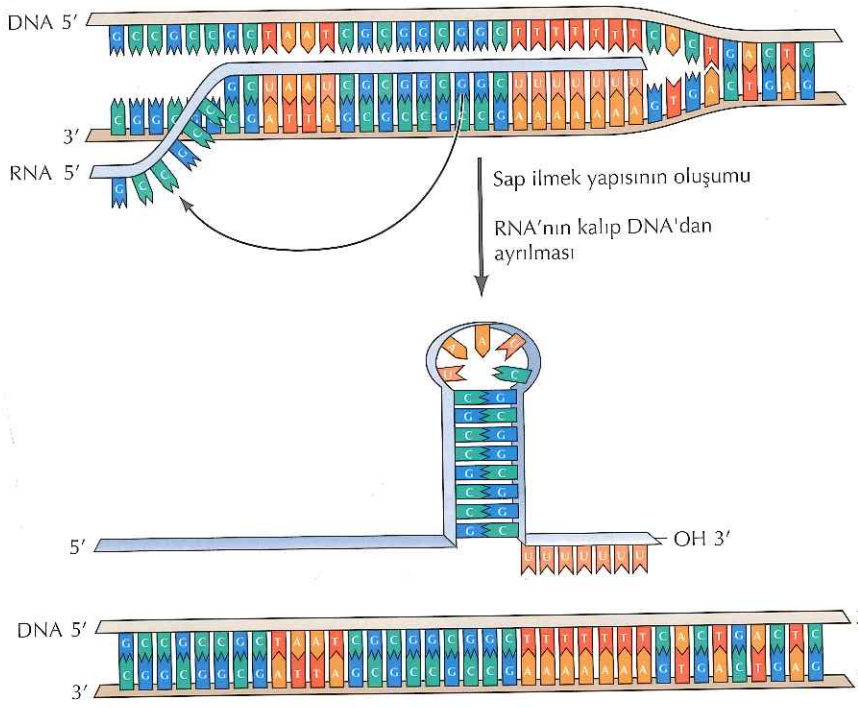


Şekil 8.4 Bakteri RNA polimerazının yapısı Polimerazın α alt birimi yeşil, β mavi, β′ pembe ve ω alt birimi sarı ile renklendirilmiştir. (Rockefeller Üniversitesi'nden Seth Darst'ın izni ile.)

olduğu için, kapalı-promotör kompleksi olarak tanımlanır. Daha sonra polimeraz, DNA'nın 12-14 bazını (yaklaşık -12 ile +2 arası) açarak, tek iplikli DNA'nın transkripsiyon için kalıp olmaya uygun olduğu açık-promotör kompleksini oluşturur. Transkripsiyon, iki serbest NTP'nin birbirine bağlanması ile başlar. Yaklaşık ilk 10 nükleotidin eklenmesinden sonra σ polimerazdan ayrılır. Sonrasında polimeraz promotörü terk eder ve büyüyen RNA zincirinin uzamasının devam etmesi için kalıp DNA boyunca ileriye doğru hareket eder.

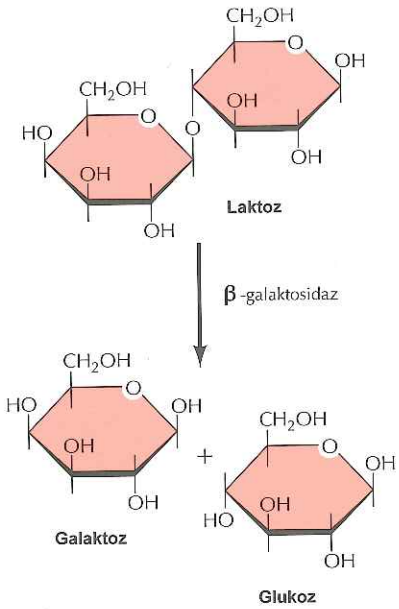
Uzama sırasında polimeraz mRNA sentezine devam ederken kalıp ile bağlantıda kalır. Polimeraz yol alırken, önündeki kalıp DNA'yı açarak ve ardındaki DNA'yı geri sararak, transkripsiyon bölgesinde yaklaşık 15 baz çiftlik bir bölgeyi açık kalacak şekilde tutar. Açık tutulan bu DNA bölümünde, uzayan RNA zincirinin 8-9 bazı, eşlenik (komplementer) kalıp DNA zincirine bağlıdır. Bakteri RNA polimerazının yüksek çözünürlüklü yapısal analizleri, β ve β' alt birimlerinin DNA kalıbını kavrayan yengeç kıskacına benzer bir yapı oluşturduğunu göstermiştir (**Şekil 8.4**). β ve β' alt birimleri arasındaki bir iç kanal, DNA'nın yaklaşık 20 baz çiftlik bir kısmını barındırır ve RNA sentezinin gerçekleştiği yer olan polimerazın aktif bölgesini içerir.

RNA sentezi, polimeraz sonlandırma sinyaliyle karşılaşıncaya kadar devam eder, bu noktada transkripsiyon durur. RNA, polimerazdan ayrılır ve enzim kalıp DNA'yı terk eder. *E. coli*'de transkripsiyonun sonlandırılması için iki alternatif mekanizma vardır. En basit ve en sık rastlanılan tip sonlandırma sinyali, ardından yaklaşık yedi A nükleotidi gelen, ters tekrarlı simetrik, GC-zengin bir diziden oluşur (**Şekil 8.5**). GC-zengin ters tekrarların transkripsiyonu, komplementer baz eşleşmesiyle



Şekil 8.5 Transkripsiyonun sonlanması Transkripsiyonun sonlanması, ardından yedi A nükleotidi gelen ters tekrarlı GC-zengin bir dizi ile gerçekleşir. Ters tekrarlı bölge RNA'da kararlı bir sap-ilmek yapısı oluşturur ve transkripsiyonu sonlandırarak RNA'nın kalıp DNA'dan ayrılmasını sağlar.

kararlı bir sap-ilmek yapısı oluşturan bir RNA parçasının ortaya çıkmasıyla sonuçlanır. İçerisinde bu gibi kendi kendisiyle eşlenik yapıların oluşumu, RNA'nın DNA ile olan bağlantısını bozulmasına neden olur ve transkripsiyonu sonlandırır. A ve U arasındaki hidrojen bağlarının G ve C arasındakilerden daha zayıf olması nedeniyle, ters tekrar dizilerinin aşağı yönündeki A nükleotidlerin varlığının, RNA'nın kalıbından ayrılmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Alternatif olarak, bazı genlerin transkripsiyonunun sonlandırılması, Rho adı verilen ve 60 nükleotitten uzun tek iplikli RNA parçalarına bağlanabilen, spesifik bir sonlandırma proteini tarafından yapılır. Bakteri mRNA'ları ribozomlarla bağlantılı olduğundan ve translasyon ile transkripsiyon birbirine eş zamanlı gerçekleştiğinden, böyle uzun tek zincirli RNA bölgeleri ancak mRNA'nın sonlarına doğru açığa çıkarlar.

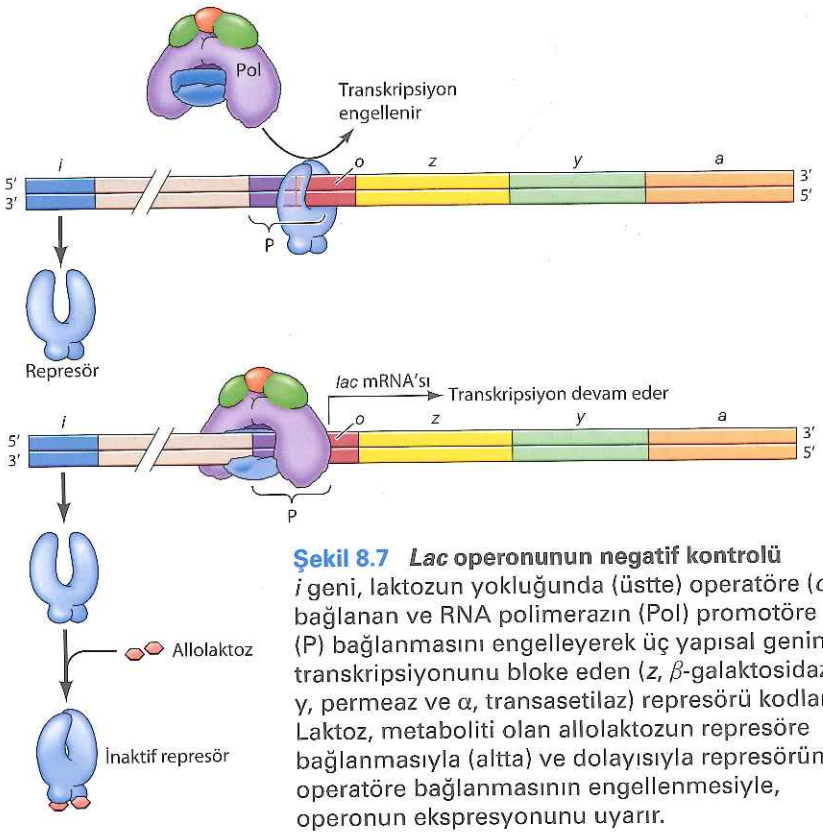


Şekil 8.6 Laktoz metabolizması β-galaktosidaz laktozun galaktoz ve glukoza hidrolizini katalizler.

Represörler ve transkripsiyonun negatif kontrolü

Transkripsiyonun düzenlenmesi hem başlangıç hem de uzama evrelerinde gerçekleşebilir, ancak bakteriyel transkripsiyonun düzenlenmesi daha çok başlangıç evresinde gerçekleşir. *E. coli*'de gen düzenlenmesinin öncü çalışmaları, 1950'lerde François Jacob ve Jacques Monod tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacılar ve meslektaşları, glukoz ve galaktoza parçalanarak enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılabilen laktozun metabolizmasında yer alan enzimlerin ekspresyonunu incelediler (Şekil 8.6). Laktozun parçalanmasını katalizleyen enzim (β-galaktosidaz) ve laktoz metabolizmasında yer alan diğer enzimler, yalnızca ortamda bakterinin kullanabileceği laktoz varsa eksprese edilirler. Aksi takdirde, hücre gereksiz RNA ve protein sentezi için enerji harcamaktan kaçınma yeteneğindedir. Böylece laktoz, kendi metabolizmasında yer alan enzimlerin sentezini uyarır. β-galaktosidaza ilave olarak, laktoz metabolizması birbirine yakın bağlantılı başka iki genin ürünlerini de içerir: hücre içine laktoz taşıyan laktoz permeaz ve permeaz tarafından laktozla beraber hücre içine taşınan toksik tiyogalaktosidleri inaktive ettiği düşünülen transasetilaz.

Jacob ve Monod, tamamıyla genetik deneylere dayanarak, bu genlerin ekspresyonlarını düzenleyen ve transkripsiyonel düzenlenmesini anlamamızda halen temel bir model teşkil eden mekanizmayı ortaya çıkarmışlardır. β-galaktosidaz, permeaz ve transasetilaz enzimlerini kodlayan genler **operon** adı verilen tek bir ünite olarak eksprese edilirler (Şekil 8.7). Bu genlerin düzenlenmesinde



Şekil 8.7 *Lac* operonunun negatif kontrolü *i* geni, laktozun yokluğunda (üstte) operatöre (*o*) bağlanan ve RNA polimerazın (Pol) promotöre (P) bağlanmasını engelleyerek üç yapısal genin transkripsiyonunu bloke eden (*z*, β-galaktosidaz; *y*, permeaz ve α, transasetilaz) represörü kodlar. Laktoz, metaboliti olan allolaktozun represöre bağlanmasıyla (altta) ve dolayısıyla represörün operatöre bağlanmasının engellenmesiyle, operonun ekspresyonunu uyarır.

hasarlı olan mutantlarla yapılan çalışmalar, operonun ekspresyonunu kontrol eden ve *o* ve *i* olarak adlandırılan iki ayrı lokus tanımlamıştır. Operon transkripsiyonu, transkripsiyon başlama yerine bitişik olan *o* (**operatör**) tarafından kontrol edilir. Fiziksel olarak operon ile bağlantılı olmayan *i* geni, operatör DNA'ya bağlanarak transkripsiyonu düzenleyen bir protein kodlar. Önemli olarak, işlevsel bir *i* gen ürünü oluşturamayan mutantlar, laktozun ortamda mevcut olmadığı durumlarda bile operonu devamlı (konstitütif) olarak eksprese ederler. Bu sonuç, normal *i* gen ürününün *o*'ya bağlı iken transkripsiyonu engelleyen bir **represör** olduğuna işaret eder. Ortama laktoz eklenmesi, allolaktozun (laktozun metaboliti) represöre bağlanmasını ve dolayısıyla represörün operatör DNA'ya bağlanmasının engellenmesini sağlayarak, operonun indüksiyonuna neden olur.

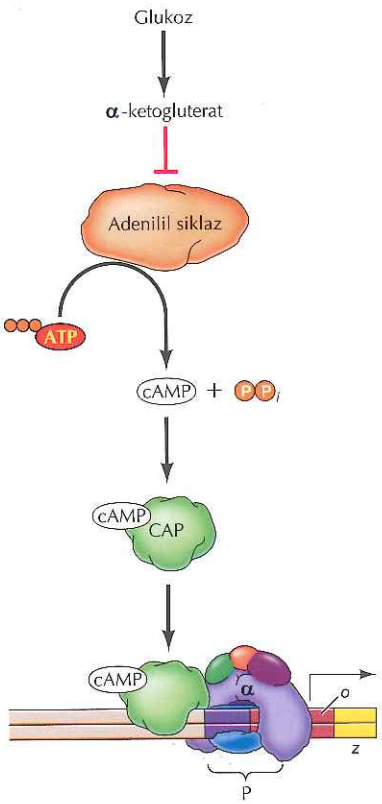
Bu temel modelin doğrulanması, 1960'larda Walter Gilbert tarafından yapılan *lac* represörünün izolasyonu ve operatör DNA'ya bağlanmasının analizi dahil, çeşitli deneylerle sağlandı. Moleküler analizler, transkripsiyon başlangıç noktasının birkaç baz öncesinden başlayan yaklaşık 20 baz çiftlik DNA'yı operatör olarak belirledi. Represör bu bölgeye bağlanır ve RNA polimerazın promotöre bağlanmasını engelleyerek transkripsiyonu bloke eder.

Laktoz operonu ile örneklenen gen düzenlenmesinin temel ilkesi, transkripsiyonun regülatör proteinlerin spesifik DNA dizileri ile olan etkileşimleri yoluyla kontrol edilmesidir. Düzenlenmenin bu genel biçimi, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin her ikisine de büyük ölçüde uygulanabilir. Sadece aynı DNA molekülünün üzerinde yer alan birbiriyle bağlantılı genlerin ekspresyonunu etkilediği için, operatör gibi regülatör diziler ***cis*-etkili kontrol elemanları** olarak adlandırılır. Diğer taraftan, represör benzeri proteinler hücre içindeki diğer kromozomlarda bulunan genlerin ekspresyonunu etkileyebilir. Represörün bağlanması transkripsiyonu engellediği için, *lac* operonu transkripsiyonun negatif kontrolüne bir örnektir. Bu durum her zaman böyle değildir. Regülatör proteinlerin transkripsiyon inhibitörü değil aktivatörü olduğu birçok pozitif kontrol örneği de vardır.

Transkripsiyonunun pozitif kontrolü

E. coli'de pozitif kontrolün en iyi çalışılmış örneği; glukozun, alternatif karbon ve enerji kaynağı sağlayan diğer şekerlerin (laktoz dahil) yıkılmasında (katabolizma) görevli enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonu üzerine olan etkisidir. Glukoz mevcut olduğu sürece öncelikle glukoz kullanılır ve alternatif enerji kaynaklarının katabolizmasında yer alan enzimler sentezlenmez. Örneğin *E. coli,* hem glukoz hem de laktoz içeren bir ortamda üretiliyorsa, *lac* operonu uyarılmaz ve bakteri tarafından yalnızca glukoz kullanılır. Böylece, normal uyarıcısının (laktoz) varlığında bile, glukoz *lac* operonunu baskılar.

Glukoz tarafından baskılanmanın (genellikle katabolit baskılanması olarak adlandırılır), siklik AMP (cAMP) düzeyine bağlı pozitif kontrol sistemi yoluyla sağlandığı bilinmektedir (**Şekil 8.8**). Bakterilerde ATP'yi cAMP'ye çeviren adenilil siklaz enzimi, sitrik asit döngüsünde glukoz yıkımında bir ara ürün olan



Şekil 8.8 ***Lac* operonunun glukoz ile kontrolü** Glukoz, ATP'yi siklik AMP'ye (cAMP) çeviren adenilil siklazı inhibe eden α-ketogluterata metabolize edilir. Ancak ortamda glukoz seviyesi düşükse, siklik AMP katabolit aktivatör proteine (CAP) bağlanır ve onun laktoz gibi alternatif şekerlerin metabolizmasıyla ilişkili çeşitli operonların düzenleyici dizilerine bağlanmasını uyarır. CAP, RNA polimerazın promotöre (P) bağlanmasını kolaylaştırmak için polimerazın α alt birimi ile etkileşime girer.

α-ketogluterat tarafından inhibe edilir (bkz. Şekil 3.4). Ortamda glukoz varken, α-ketogluterat üretilir ve böylece adenilil siklaz inhibe olur. Ancak ortamda glukoz veya diğer verimli kullanılabilen karbon ve enerji kaynakları yokken, α-ketogluterat düzeyi azalır ve bu durum adenilil siklazın aktivasyonuna ve dolayısıyla cAMP'nin sentezine yol açar. Daha sonra cAMP, katabolit aktivatör protein (CAP) olarak adlandırılan transkripsiyon düzenleyici bir proteine bağlanır. cAMP'nin CAP'ye bağlanması, CAP'ın kendi hedef DNA dizisine bağlanmasını uyarır. Bu dizi, *lac* operonunun içinde ve transkripsiyon başlama noktasının yaklaşık 60 baz yukarısındadır. CAP bu durumda RNA polimerazın α alt birimi ile etkileşime girer ve polimerazın promotöre bağlanmasını kolaylaştırarak transkripsiyonu aktive eder.

Ökaryotik RNA Polimerazlar ve Genel Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon süreci, bütün hücrelerde aynı temel mekanizmalarla gerçekleşmesine karşın, ökaryotik hücrelerde bakterilerdekinden çok daha karmaşıktır. Bu durum bakteriyel ve ökaryotik sistemler arasındaki üç belirgin farkla açığa çıkar. Bunlardan ilki; bakterilerde bütün genler tek bir kor RNA polimeraz ile transkripsiyona uğrarken, ökaryotik hücrelerin farklı gen sınıflarını transkribe eden üç farklı nükleer RNA polimeraz içeriyor olmasıdır. İkincisi, ökaryotik RNA polimerazların, spesifik olarak transkripsiyonu başlatmak ve düzenlemek için çeşitli ek proteinler ile etkileşime girmeye gereksinim duymasıdır. Son olarak, ökaryotlarda transkripsiyon kromatin üzerinde gerçekleşir ve kromatin yapının düzenlenmesi, ökaryotik genlerin transkripsiyonel aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir faktördür. Ökaryotik transkripsiyonun bu artmış karmaşıklığı, büyük olasılıkla, çok hücreli organizmaların çok sayıdaki farklı tip hücrelerinde aktivitelerin yönetilmesi için gerekli olan gen ekspresyonunun çok yönlü düzenlenmesine olanak sağlamaktadır.

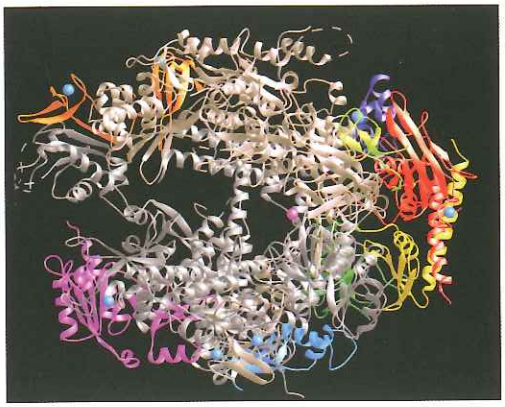
Ökaryotik RNA polimerazlar

Ökaryotik hücrelerde, farklı gen sınıflarının transkripsiyonunu gerçekleştiren, üç farklı nükleer RNA polimeraz bulunur (**Tablo 8.1**). Protein-kodlayan genlerin ürünü olan mRNA'lar RNA polimeraz II tarafından sentezlenir. RNA polimeraz II aynı zamanda ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonunun önemli düzenleyicileri olan mikroRNA'ları (miRNA'lar) ve kodlamayan uzun RNA'ları (lncRNA'lar) transkribe eder. Ribozomal RNA'lar (rRNA'lar) ve taşıyıcı RNA'lar (tRNA'lar) RNA polimeraz I ve III tarafından transkribe edilirler. RNA polimeraz I spesifik olarak, santrifügasyon sırasındaki çökme hızlarına göre, 28S, 18S ve 5,8S olarak adlandırılmış en büyük üç rRNA türünün transkripsiyonundan sorumludur. RNA polimeraz III, tRNA'ları ve ribozomal RNA'ların en küçük türünü (5S rRNA) kodlayan genleri transkribe eder. Kesip-ekleme (*splicing*) işlemi ve protein taşınması ile ilgili küçük RNA'ların (snRNA ve scRNA'lar) bazıları da RNA polimeraz III tarafından sentezlenir, diğerleri polimeraz II transkriptleridir. Bunların dışında, kloroplast ve mitokondrilerde ayrı RNA polimerazlar (bakteriyal RNA polimerazlara benzerler) bulunur ve spesifik olarak nerede bulunuyorlarsa o organelin DNA'sını transkribe ederler.

Tablo 8.1 Ökaryotik RNA Polimerazlar Tarafından Transkribe Edilen Gen Sınıfları

Sentezlenen RNA tipi	RNA polimeraz
Nükleer genler	
mRNA	II
miRNA	II
lncRNA	II
tRNA	III
rRNA	
5,8S, 18S, 28S	I
5S	III
snRNA ve scRNA	II ve III[a]
Mitokondri genleri	Mitokondriyel[b]
Kloroplast genleri	Kloroplast[b]

[a] Bazı küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar) ve küçük sitoplazmik RNA'lar (scRNA'lar) polimeraz II, diğerleri polimeraz III tarafından sentezlenir.
[b] Mitokondriyel ve kloroplast RNA polimerazları, bakteri enzimlerininkine benzerdir.



Şekil 8.9 Mayadaki RNA polimeraz II'nin yapısı Her alt birim farklı renklerle gösterilmiştir. (P. D. Kramer et al., 2001. *Science* 292: 1863'den)

Nükleer RNA polimerazların üçü de, her biri 12 ile 17 arası farklı alt birimden oluşan kompleks enzimlerdir. Farklı promotörleri tanımalarına ve farklı sınıf genleri transkribe etmelerine rağmen, her birinin hem birbiriyle hem de bakteriyel RNA polimerazla bazı ortak özellikleri vardır. Özellikle, her üç ökaryotik RNA polimeraz da, dokuz korunmuş alt birim içerir ve bunlardan beşi bakteriyel RNA polimerazın α, β, β' ve ω alt birimlerine benzerdir. Maya RNA polimeraz II'nin yapısının bakteri enzimininkine çarpıcı bir biçimde benzer olması (Şekil 8.9), bütün RNA polimerazların DNA'yı transkribe ederken temelde korunmuş mekanizmaları kullandıkları izlenimini uyandırmaktadır.

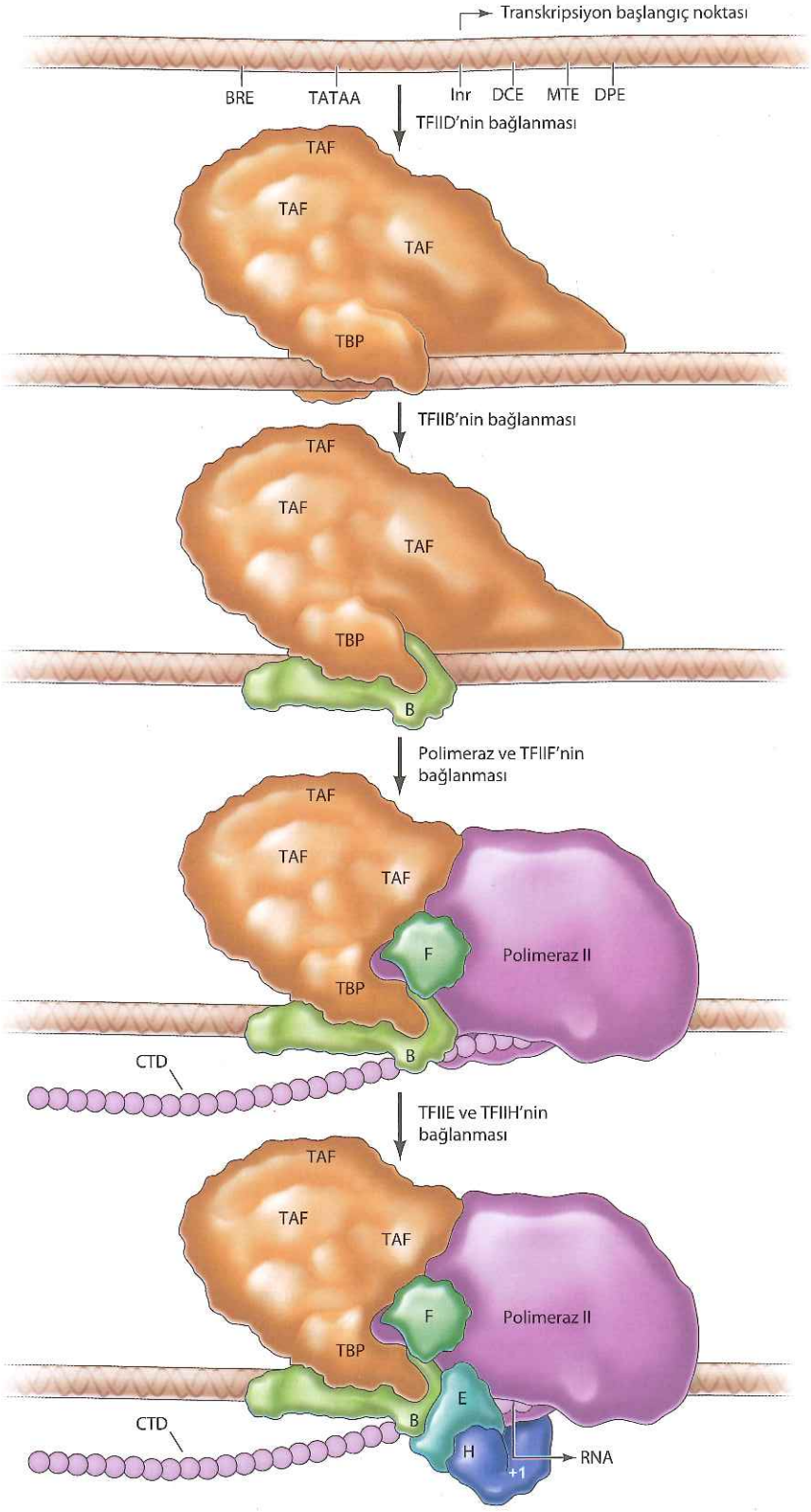
Genel transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz II ile transkripsiyonun başlatılması

Protein-kodlayan genlerden mRNA sentezlenmesinden sorumlu olduğu için, ökaryotlardaki transkripsiyon çalışmalarının çoğunun odak noktası RNA polimeraz II olmuştur. Bu enzimin araştırıldığı ilk çalışmalar, aktivitesinin bakteriyel RNA polimerazınınkinden farklı olduğunu gösterdi. Saflaştırılmış RNA polimerazın promotör içeren DNA'ya eklenmesiyle *in vitro* ortamda kolayca bakteri genlerinin hatasız bir şekilde transkripsiyonu mümkünken, bu ökaryotik sistemlerde mümkün olamadı. Bu farklılığın nedeni, 1979'da Robert Roeder ve çalışma arkadaşları tarafından, RNA polimeraz II'nin transkripsiyonu ancak reaksiyona bazı proteinler eklendiğinde başlatabildiğinin gösterilmesiyle açığa çıktı. Böylelikle, ökaryotik sistemde transkripsiyonun, polimeraz ile bağlantılı olmayan farklı başlangıç faktörlerine (bakteriyel σ faktörün aksine) gereksinim duyduğu ortaya çıktı.

Nükleer özütlerin daha sonraları biyokimyasal olarak fraksiyonlarına ayrılması, RNA polimeraz II'nin transkripsiyonu başlatması için gerekli olan spesifik proteinlerin (**transkripsiyon faktörleri** olarak adlandırılır) tanımlanmasına yol açtı. **Genel transkripsiyon faktörleri,** polimeraz II promotörlerinin çoğunda transkripsiyonun başlamasında görev alır ve bu nedenle temel transkripsiyon mekanizmasının bir bölümünü oluşturur. Diğer gene özgü transkripsiyon faktörleri (bölüm içinde daha sonra ele alınacak) söz konusu genlerin ekspresyonunu kontrol eden DNA dizilerine bağlanırlar ve bu sayede gen ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumludurlar. İnsan genomundaki genlerin yaklaşık %10'unun transkripsiyon faktörü kodladığı tahmin edilmektedir ki, bu oran bu proteinlerin önemini vurgular.

Polimeraz II tarafından transkribe edilen genlerin promotörleri, transkripsiyon

Şekil 8.10 Polimeraz II başlangıç-öncesi kompleksinin *in vitro* oluşumu Polimeraz II promotörlerindeki dizi elemanları: transkripsiyon başlangıç noktasının 25 ile 30 nükleotid yukarısında bulunan TATA kutusunu (konsensus dizi TATAA), transkripsiyon başlangıç noktasının yaklaşık 35 nükleotid yukarısındaki TFIIB tanıma elemanını (BRE), transkripsiyon başlangıç noktasını kapsayan başlatıcı elemanı (Inr) ve transkripsiyon başlangıç noktasının aşağısında bulunan birtakım elemanları (DCE, MTE ve DPE) içerir. Transkripsiyon kompleksinin oluşumu, transkripsiyon faktörü TFIID'nin bağlanmasıyla başlar. TFIID'nin bir alt birimi olan TBP ya da TATA'ya bağlanan protein TATA kutusuna bağlanırken, diğer alt birimler (TBP-bağlantılı faktörler yada TAF'lar) Inr ve aşağısındaki promotör elemanlarına bağlanırlar. Daha sonra TFIIB (B) TBP'ye ve BRE dizisine bağlanır, Bunu polimerazın TFIIF (F) ile beraber promotöre bağlanması takip eder. Son olarak, TFIIE (E) ve TFIIH (H) kompleks ile etkileşime girer. CTD, RNA polimerazın en büyük alt biriminin C-ucu bölgesidir.

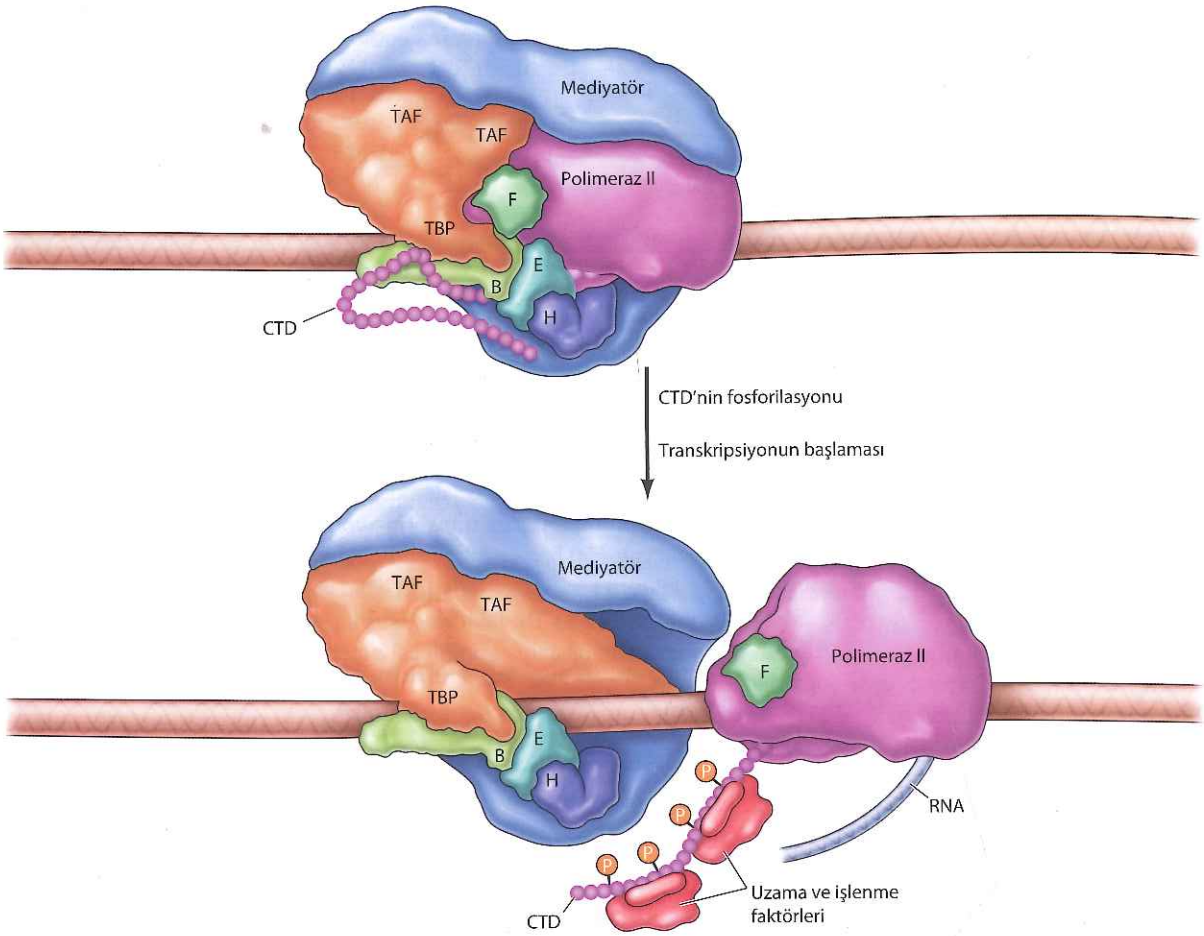

Transkripsiyon başlangıç noktası
BRE
TATAA
Inr
DCE
MTE
DPE
TFIID'nin bağlanması
TAF
TAF
TAF
TBP
TFIIB'nin bağlanması
TAF
TAF
TAF
TBP
B
Polimeraz ve TFIIF'nin bağlanması
TAF
TAF
TAF
F
Polimeraz II
TBP
B
CTD
TFIIE ve TFIIH'nin bağlanması
TAF
TAF
TAF
F
Polimeraz II
TBP
E
B
CTD
H
+1
RNA

başlangıç noktasının etrafını çevreleyen birçok farklı dizi elemanı içerir (Şekil 8.10). Bu elemanlardan ilk tanımlananı, transkripsiyon başlangıç noktasının 25 ila 30 nükleotid yukarısında bulunan TATAA benzeri bir dizi olmuştur. Bu dizi (**TATA kutusu** olarak adlandırılır), *E. coli* promotörlerinin -10 dizi elamanına benzer ve önceleri RNA polimeraz II tarafından transkribe edilen tüm genlerin promotörlerinde bulunan genel bir ayırt edici özellik olarak düşünülmüştür. Ancak son yıllarda yapılan genom-boyu araştırmalar, TATA kutularının RNA polimeraz II promotörlerinin sadece %10-20'sinde bulunduğunu göstermiştir. RNA polimeraz II tarafından transkribe edilen genlerin promotörlerinde bulunan diğer ilave dizi elemanları: transkripsiyon başlangıç noktalarını kapsayan başlatıcı elemanlar (Inr), transkripsiyon başlangıç noktalarının yukarısında bulunan TFIIB tanıma elemanları (BRE) ve bu noktalarının aşağısında bulunan birtakım promotör elemanlardır (DCE, MTE ve DPE). Bu kor promotör elemanları, farklı genlerin promotörlerinde farklı kombinasyonlarda bulunurlar ve genel transkripsiyon faktörlerinin promotöre bağlanmasını için beraberce işlev görürler.

RNA polimeraz II'nin yeniden oluşturulmuş *in vitro* sistemlerde transkripsiyonu başlatması için, minimum beş genel transkripsiyon faktörüne ihtiyacı vardır (bkz. Şekil 8.10). Transkripsiyon kompleksinin oluşmasındaki ilk basamak, TFIID olarak adlandırılan transkripsiyon faktörünün promotöre bağlanmasıdır (TF *t*ranskripsiyon *f*aktörünü, II ise polimeraz II'yi simgeler). TFIID, **TATA'ya-bağlanan protein (TBP)** ve **TBP-bağlantılı faktörler (TAF'lar)** olarak adlandırılan 13 veya 14 farklı polipeptidi içeren çok sayıda alt birimden oluşur. TBP spesifik olarak TATA kutusuna bağlanırken, TFIID'nin diğer alt birimleri (TAF'lar) Inr, DCE, MTE ve DPE dizilerine bağlanırlar. TFIID'nin bağlanmasını, ikinci genel transkripsiyon faktörü olan TFIIB'nin gruba eklenmesi izler. TFIIB, TBP'ye ve BRE dizisine bağlanarak RNA polimeraz II'ye bir köprü görevi görür ve üçüncü bir faktör olan TFIIF ile birlikte oluşan TBP-TFIIB kompleksine bağlanmasını sağlar.

RNA polimeraz II'nin promotördeki komplekse katılmasını takiben, iki ilave faktörün (TFIIE ve TFIIH) daha bağlanmasıyla başlangıç öncesi kompleksin oluşumu tamamlanır. TFIIH, en az iki önemli rolü olan, çok alt birimli bir faktördür. Bunlardan ilki, TFIIH'nin iki alt biriminin başlangıç noktasının etrafındaki DNA'yı açan helikazlar olmasıdır (TFIIH'nin bu alt birimleri Bölüm 7'de ele alındığı gibi nükleotid kesip-çıkarma tamiri için gerekli olan XPB ve XPD proteinleridir). TFIIH'nin diğer alt birimi, RNA polimeraz II'nin en büyük alt biriminin C-ucu bölgesinde bulunan tekrar dizilerini fosforilleyen bir protein kinazdır. Polimeraz II C-ucu bölgesi (veya CTD) yedi amino asitin ardışık tekrarlarından (mayada 26 ve insanda 52 tekrar) oluşur ve bu yedili tekrarların konsensus dizisi Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser'dir. Bu CTD tekrarlarındaki serin-5'in (beşinci amino asit) TFIIH tarafından fosforilasyonu, polimerazın başlangıç öncesi kompleksten ayrılmasına neden olur ve transkripsiyonun başlamasına yol açar.

Her ne kadar yukarıda anlatılan beş genel transkripsiyon faktörü ve RNA polimeraz II'nin promotör üzerinde kompleks oluşturmaları, *in vitro* transkripsiyonun gerçekleşmesini sağlayan minimum gereklilik ise de, hücre içinde transkripsiyonun uyarılması için ilave faktörlere ihtiyaç vardır. Bu faktörler, 20'den fazla farklı alt birimi olan ve hem genel transkripsiyon faktörleri hem de RNA polimeraz ile etkileşen **Mediyatör** denilen büyük bir protein kompleksini içerir (Şekil 8.11). Mediyatör kompleksi sadece bazal transkripsiyonu uyarmakla kalmaz, aynı zamanda genel transkripsiyon faktörleri ile gen ekspresyonunu düzenleyen gene-özgül transkripsiyon faktörleri arasındaki bağlantının kurulmasında önemli rol oynar. Başlangıç-öncesi kompleksin bir



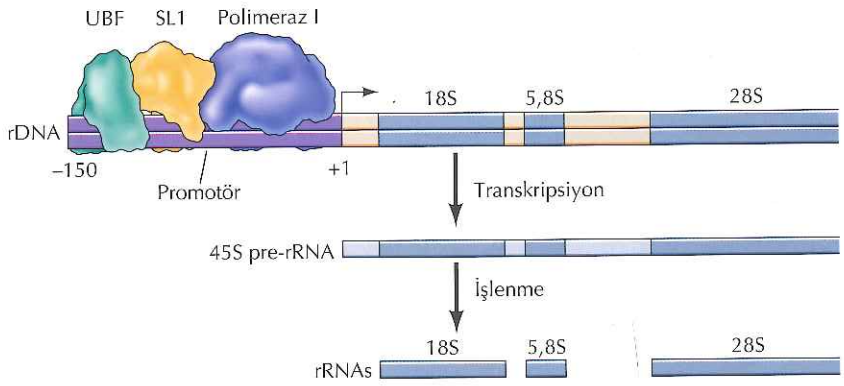
Şekil 8.11 RNA polimeraz II/Mediyatör kompleksleri ve transkripsiyonun başlaması RNA polimeraz II promotörde, genel transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra Mediyatör proteinlere de bağlanır (bkz. Şekil 8.10). Mediyatör kompleks, polimeraz II'nin fosfrillenmiş C-ucu bölgesine (CTD) bağlanır ve CTD'nin fosforilasyonunun ardından transkripsiyonun başlamasıyla serbest bırakılır. Fosforillenmiş CTD daha sonra, mRNA sentezine ve işlenmesine olanak sağlayan uzama ve işlenme faktörlerine bağlanır.

araya gelmesi ve polimerazın C-ucu bölgesinin fosforilasyonunun ardından, Mediyatör proteinler polimerazdan ayrılır. Daha sonra fosforillenmiş CTD, bu bölümde ileride ele alınacağı üzere, transkripsiyonun uzamasını kolaylaştıran ve mRNA işlenmesinde görev alan diğer proteinlere bağlanır.

RNA polimeraz I ve III ile transkripsiyon

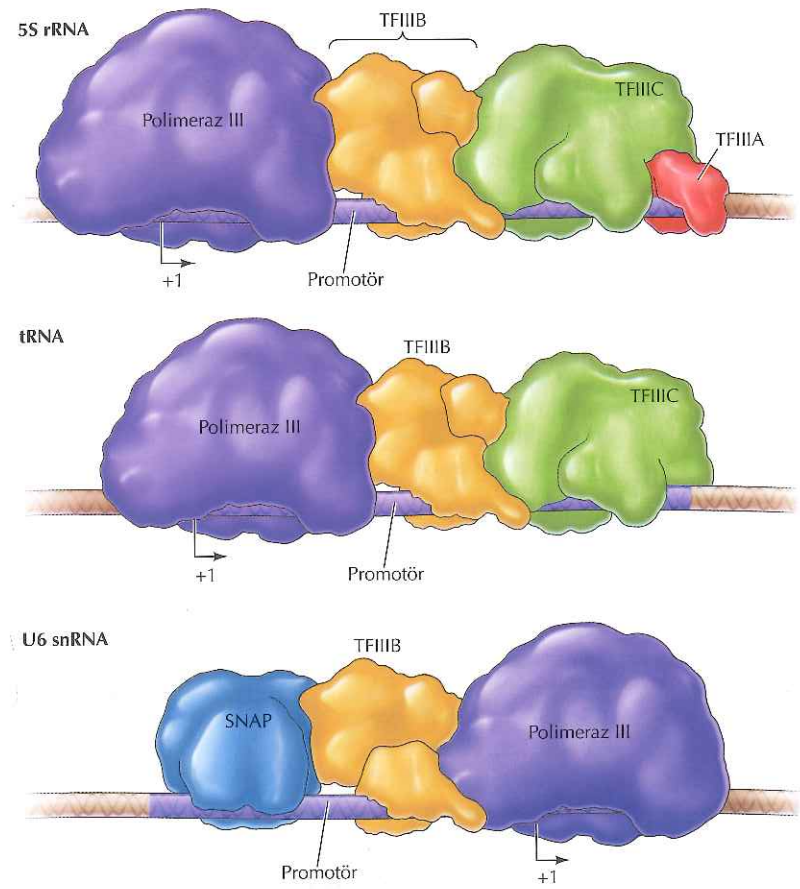
Önceden bahsedildiği gibi, ökaryotik hücrelerde ribozomal RNA'ları, taşıyıcı RNA'ları ve bazı kodlamayan küçük RNA'ları kodlayan genlerin transkripsiyonundan farklı RNA polimerazlar sorumludur. RNA polimeraz II'ye benzer şekilde, diğer ökaryotik RNA polimerazlar da uygun promotör dizilerine bağlanmak için ilave transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duyarlar.

RNA polimeraz I sadece, ardışık tekrarlar halinde bulunan ribozomal RNA genlerinin transkripsiyonudan sorumludur. Bu genlerin transkripsiyonu önce



Şekil 8.12 Ribozomal RNA geninin transkripsiyonu Ribozomal DNA (rDNA) büyük bir RNA molekülü (45S pre-rRNA) üretmek üzere transkripsiyona uğrar ve daha sonra bu ürün 28S, 18S ve 5,8S rRNA şeklinde üç parçaya kesilir. İki transkripsiyon faktörü, UBF (yukarı bölge bağlanma faktörü) ve SL1 (seçicilik faktörü 1), işbirliği yaparak rDNA promotörüne bağlanır ve RNA polimeraz I'in başlangıç kompleksi oluşturmak üzere yapıya katılması sağlar.

büyük bir 45S öncül rRNA (pre-rRNA) ürünü verir. Bu ürün daha sonra 28S, 18S ve 5,8S rRNA olacak şekilde işlemden geçirilir (Şekil 8.12). Ribozomal RNA genlerinin promotörleri, transkripsiyon başlama noktasının hemen yukarısında, yaklaşık 150 baz çiftlik bir bölgeyi kapsar. Bu promotör diziler, iki transkripsiyon faktörü tarafından tanınır: UBF (yukarı bölge bağlanma faktörü) ve SL1 (seçicilik faktörü 1). Bu faktörler, işbirliği yaparak promotöre bağlanırlar ve RNA polimeraz I'in başlama kompleksi oluşturmak üzere yapıya katılmasını sağlarlar.



5S rRNA'nın, tRNA'ların ve kesip-ekleme işlemi ve protein taşınmasında görev alan bazı küçük nükleer RNA'ların (snRNA'lar) genleri polimeraz III tarafından transkribe edilir. Bu genlerin transkripsiyonu, üç farklı promotör sınıfından gerçekleşir. Bunlardan ikisi, transkripsiyona uğrayan dizinin yukarısında değil, içinde yer alır (Şekil 8.13). Saflaştırılan ilk trans-

Şekil 8.13 RNA polimeraz III genlerinin transkripsiyonu Polimeraz III tarafından transkribe edilen genlerin ekspresyonu, üç farklı tip promotörden gerçekleşir. 5S rRNA ve tRNA genlerinin promotörleri, transkripsiyon başlangıç noktasının aşağısında yer alır. 5S rRNA geninin transkripsiyonu, TFIIIA'nın bağlanmasını takiben TFIIIC, TFIIIB ve polimerazın bağlanmasıyla başlar. tRNA ve snRNA genlerinin promotörleri, TFIIIA'ya bağlanma bölgeleri içermez ancak başka faktörler (sırasıyla TFIIIC ve SNAP) tarafından tanınırlar. TFIIIB ve RNA polimeraz, bu faktörler sayesinde transkripsiyon kompleksine eklenirler.

kripsiyon faktörü olan TFIIIA, 5S rRNA promotöründeki spesifik DNA dizisine bağlanarak, transkripsiyon kompleksinin yapılanması sürecini başlatır. Bu bağlanmayı sırayla, TFIIIC, TFIIIB ve polimerazın bağlanması izler. Taşıyıcı RNA ve snRNA genleri gibi RNA polimeraz III tarafından transkribe edilen diğer genlerin promotörleri de başka faktörler (sırasıyla TFIIIC ve SNAP) tarafından tanınır. Bu faktörler TFIIIB ve polimerazın transkripsiyon kompleksine katılmasını sağlarlar.

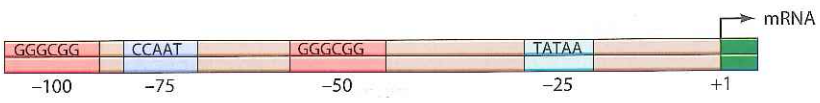
Ökaryotlarda Transkripsiyonun Düzenlenmesi

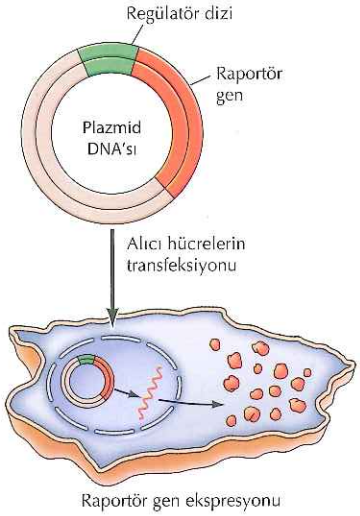
Ökaryotlarda gen ekspresyonun kontrolü, bakterilere göre çok daha karmaşık olmakla beraber, temel ilkelerin bazıları hala geçerlidir. Bakteride olduğu gibi, ökaryotik hücrelerde de transkripsiyon, spesifik regülatör (düzenleyici) dizilere bağlanan ve RNA polimerazın aktivitesini ayarlayan proteinler tarafından kontrol edilir. Bakteriler ve ökaryotik hücreler arasında transkripsiyonun düzenlenmesi açısından önemli bir fark, ökaryotik DNA'nın kromatine paketlenmesi sonucu, transkripsiyon için kalıp olarak kullanılabilirliğinin sınırlanmasıdır. Sonuç olarak, kromatin yapısındaki değişiklikler, ökaryotik hücrelerde transkripsiyonun kontrolünde anahtar rolü oynar. Günümüzde özellikle heyecan verici olan bir araştırma alanı, proteinlerin yanı sıra kodlamayan RNA'ların da ökaryotik hücrelerde kromatin yapıyı değiştirerek transkripsiyonu düzenlediğinin keşfedilmesine dayanır.

cis-etkili regülatör diziler: promotörler ve güçlendiriciler

Daha önce tartışıldığı gibi, bakterilerde transkripsiyon, birbirlerine bitişik genlerin transkripsiyonunu kontrol eden *cis*-etkili dizilere (örn., *lac* operatörü) bağlanan proteinler ile düzenlenir. Benzer *cis*-etkili diziler, ökaryotik genlerin ekspresyonunu da düzenler. Bu diziler, memeli hücrelerinde çoğunlukla, klonlanan genlerin regülatör bölge içerdiğin düşünülen kısımlarının aktivitelerinin, gen transfer analizi yöntemi ile yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Şekil 8.14). Ökaryotik regülatör diziler, genellikle ateş böceği lusiferazı gibi kolaylıkla saptanabilen bir enzimi (biyoluminesanstan sorumlu enzim) kodlayan bir raportör genin yukarı bölgesine bağlanır. Raportör genin kültüre edilen hücrelere transferini takiben eksprese edilmesi, klonlanan regülatör dizinin transkripsiyona olan etkisini doğrudan incelemek için hassas bir analiz imkanı sağlar. Böylece, biyolojik olarak aktif olan regülatör bölgeler tanımlanabilir ve bu bölgelerin içindeki spesifik dizilerin rollerinin belirlenmesi için de *in vitro* mutagenez yöntemi kullanılabilir.

RNA polimeraz II tarafından transkribe edilen genlerde, genel transkripsiyon faktörleri için spesifik bağlanma bölgesi olarak görev yapan, TATA kutusu ve Inr dizisini de içeren kor promotör elemanları vardır. Diğer *cis*-etkili diziler, gen ekspresyonunu kontrol eden geniş bir çeşitlilikteki diğer gene-özgül regülatör faktörler için bağlanma yeri olarak iş görürler. Bu *cis*-etkili regülatör diziler, her zaman olmasa da sıklıkla, transkripsiyon başlama noktasının yukarı yönünde bulunurlar. Örneğin: pek çok ökaryotik gende bulunan iki regülatör dizi, herpes simpleks virüste timidin kinaz kodlayan genin promotörünün incelenmesiyle belirlenmiştir (Şekil 8.15). Bu dizilerin her ikisi de, transkripsiyon başlangıç noktasının 100 baz çifti yukarısında yer alır ve konsensus dizileri CCAAT ve GGGCGG'dir (GC kutusu olarak adlandırılır). Bu dizilere bağlanan ve transkripsiyonu uyaran spesifik proteinler daha sonra tanımlanmıştır.



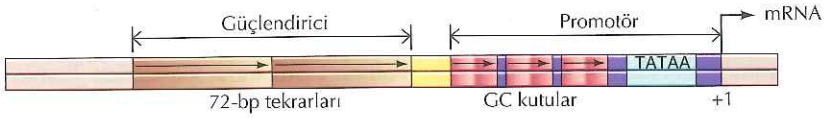


Şekil 8.14 Ökaryotik regülatör dizilerin belirlenmesi Klonlanmış ökaryotik bir genin regülatör dizisi, kolayca saptanabilen bir enzim kodlayan, raportör bir gene bağlanır. Elde edilen plazmid daha sonra, kültürdeki alıcı hücrelere transfekte edilir. Aktif bir regülatör dizi raportör genin transkripsiyonunu uyarır ve daha sonra transfekte edilen hücrelerdeki raportör gen ekspresyon miktarı analiz edilir.

Şekil 8.15 Ökaryotik bir promotör Herpes simpleks virüsünün timidin kinaz geni promotörü, TATA kutusunun yukarısında, etkin bir transkripsiyon için gerekli üç dizi elemanı içerir: iki GC kutusu (konsensus dizisi GGGCGG) ve bir CCAAT kutusu.

Bilgi İçin

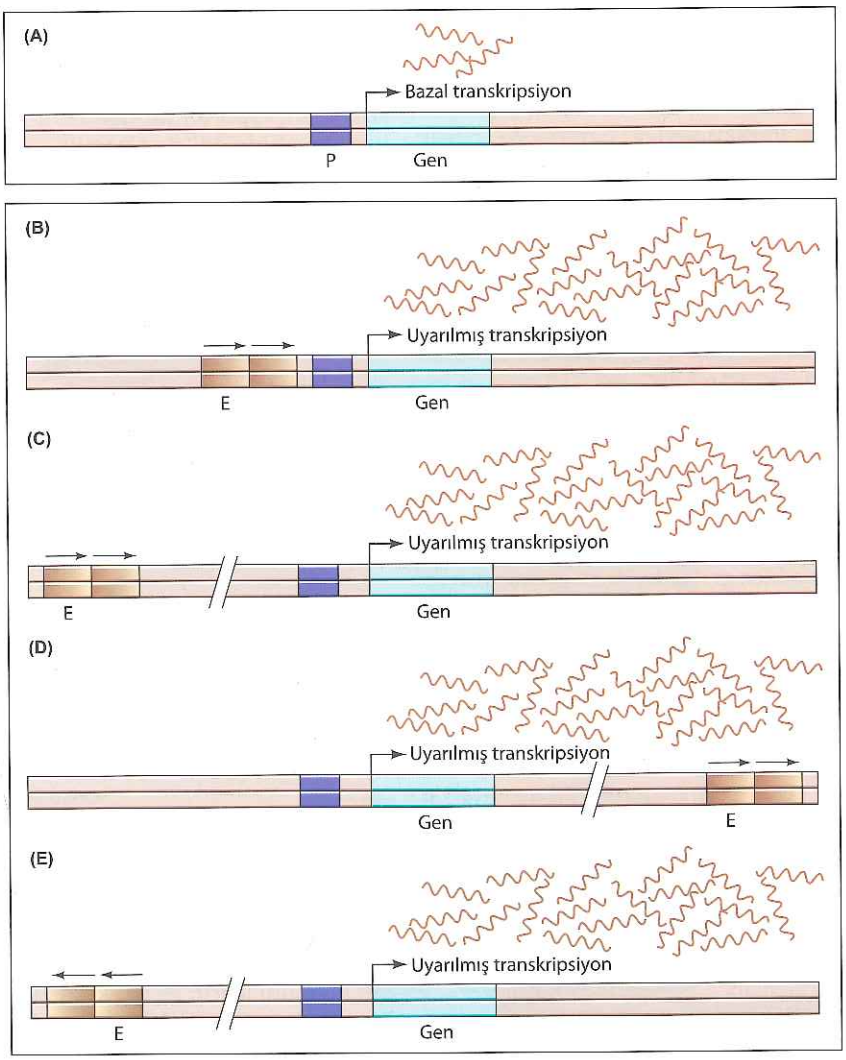
Güçlendiriciler çok uzak mesafelerden, hatta farklı kromozomlardan bile işlevlerini yerine getirebilirler. Transveksiyon olarak adlandırılan bu işlem en çok *Drosophila*'da çalışılmıştır ve bir genin *trans*-etkili güçlendiricileri tarafından, başka bir kromozom üzerindeki homologunun ekspresyonunun düzenlenmesi ile ilgilidir.



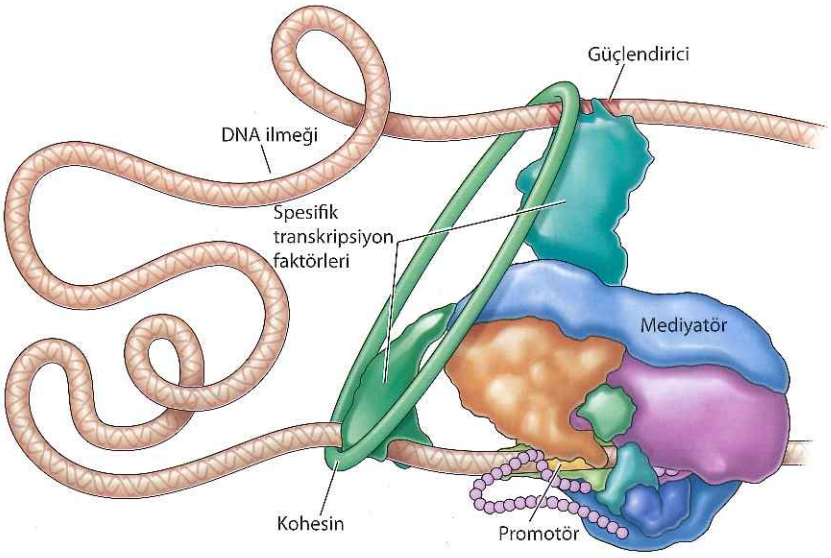
Şekil 8.16 SV40 güçlendiricisi SV40'ın erken gen ekspresyonu için kullandığı promotörü, bir TATA kutusu ve üç set halinde tekrarlanan altı GC kutusu içerir. Buna ek olarak, etkin transkripsiyon için ayrıca, yukarı yönde iki adet 72-baz-çiftlik (bp) tekrardan oluşmuş güçlendirici gereklidir.

Herpes timidin kinaz promotöründeki CCAAT ve GC kutularının göreceli basit organizasyonunun aksine, memeli hücrelerindeki pek çok gen, transkripsiyon başlangıç noktasına çok daha uzak olarak (bazen yüzlerce kilobaz) yerleşmiş regülatör diziler tarafından kontrol edilir. Bu diziler **güçlendiriciler (enhancers)** olarak adlandırılır ve ilk kez diğer bir virüs olan SV40'ın promotörünün araştırılması sırasında keşfedilmişlerdir (Şekil 8.16). Bu promotörden etkin bir transkripsiyon için, TATA kutusu ve altı GC kutusuna ek olarak, daha yukarı yönde bulunan iki adet 72-baz-çiftlik tekrar dizisi gereklidir. Bu dizilerin transkripsiyonu, SV40 promotörünün yanı sıra, uyarıldığı gibi başka promotörlerden de uyarıldığı bulunmuştur ve aktivitelerinin şaşırtıcı bir şekilde, ne transkripsiyon başlangıç noktasına olan göreceli uzaklıklarına ne de yönlerine bağlı olmadığı görülmüştür (Şekil 8.17). Bu diziler, promotöre göre konumları ve yönleri ne olursa olsun (ister yukarıda veya aşağıda, ister ileri veya geri yönde) transkripsiyonu uyarabilirler.

Güçlendiricilerin, transkripsiyon başlangıç noktalarından oldukça uzakta bulunmaları durumunda dahi işlevlerini yerine getirmesi, ilk zamanlarda promotörlerinkinden



Şekil 8.17 Güçlendiricilerin çalışma şekli Herhangi bir güçlendiriciye sahip olmayan bir gen, düşük bazal seviyede transkripsiyona uğrar (A). Bu gene, örneğin SV40'ın 72-baz-çiftlik tekrarları gibi, bir güçlendirici -E- eklenmesi transkripsiyonu arttırır. Güçlendirici, promotörün sadece hemen biraz yukarısına yerleştirildiğinde değil (B), transkripsiyon başlangıç noktasının birkaç kilobaz yukarısına veya aşağısına eklendiğinde de (C ve D) aktivite gösterir. Güçlendiriciler ayrıca, hem ileri hem de geri yönde (E) aktiftirler.

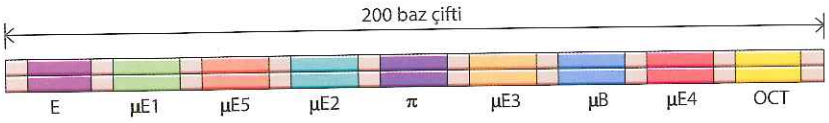


Şekil 8.18 DNA ilmeklenmesi Uzak bir noktadaki bir güçlendiriciye bağlanmış olan transkripsiyon faktörleri, aradaki DNA parçası kohesinle sabitlenen ilmekler oluşturabildiğinden, promotördeki Mediyatör ve genel transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girebilirler.

farklı bir mekanizmayla çalıştıklarını düşündürmüştür. Ancak, daha sonraları, durumun böyle olmadığı ortaya çıkmıştır: Güçlendiriciler de promotörler gibi, RNA polimerazı düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasıyla işlev görürler. Bu olay, uzaktaki bir güçlendiriciye bağlanan bir transkripsiyon faktörünün, promotördeki Mediyatöre veya genel transkripsiyon faktörlerine (örn. TFIID) bağlanan proteinlerle etkileşmesine olanak veren DNA ilmeklenmesi sayesinde mümkün olur (**Şekil 8.18**). Bu DNA ilmeklerinin oluşmasının, DNA replikasyonunu takiben kardeş kromatidlerin birbirine bağlanmasını sağlayan (Bölüm 17'de ele alınacak) kohesin denilen bir protein tarafından kolaylaştırıldığı anlaşılmaktadır. Böylelikle uzak güçlendiricilere bağlanan transkripsiyon faktörleri, promotörlere çok yakın bağlananlarla aynı mekanizma ile çalışabilirler. Dolayısıyla, güçlendiricilerin çalışma şekli ile, transkripsiyon başlama noktalarına bitişik *cis*-etkili regülatör dizilerinki arasında temel bir fark yoktur. İlginç olarak, güçlendiriciler ilk önce memeli hücrelerinde tespit edilmelerine rağmen, daha sonra bakterilerde de bulunmuştur—bu, ökaryotlarda yapılan bir çalışmanın, daha basit canlılar olan bakteriler için bir model olarak işe yaradığı alışılmadık bir örnektir.

Spesifik transkripsiyon düzenleyici proteinlerin güçlendiricilere bağlanması, hücrelerin hormonlara ve büyüme faktörlerine yanıtı esnasında olduğu kadar, gelişim ve farklılaşma süreçlerinde de gen ekspresyonunun kontrolünden sorumludur. En detaylı çalışılan güçlendirici örneklerinden biri, B lenfositlerde immünglobulin genlerinin transkripsiyonunu kontrol eden güçlendiricidir. Gen transferi deneyleri, immünglobulin güçlendiricisinin diğer hücre tiplerinde değil, sadece lenfositlerde aktif olduğunu ortaya çıkarmıştır. Dolayısıyla, bu regülatör dizinin, uygun farklılaşmış hücre tipinde immünglobulin genlerinin dokuya-özgül ekspresyonundan, en azından, kısmen sorumlu olduğu söylenebilir.

Güçlendiricilerin önemli bir özelliği, genellikle farklı transkripsiyon regülatör proteinlerinin bağlandığı, çok sayıda dizi elemanı içermeleridir. Bu proteinler beraberce çalışarak gen ekspresyonun düzenlenmesini sağlarlar. Örneğin,



Şekil 8.19 İmmünglobulin güçlendiricisi İmmünglobulin ağır-zincir güçlendiricisi, yaklaşık 200 baz uzunluktadır ve B lenfositlerde transkripsiyonu birlikte uyaran dokuz işlevsel dizi elemanı (E, μE1-5, π, μB ve OCT) içerir.

immünglobulin ağır-zincir güçlendiricisi, yaklaşık 200 baz çifti uzunluktadır ve protein-bağlayıcı yer olarak iş gören en az dokuz farklı dizi elemanı içerir (Şekil 8.19). Güçlendiricinin toplam aktivitesi, her bir dizi elemanına bağlanmış proteinlerin bileşik ortak etkisini yansıtır.

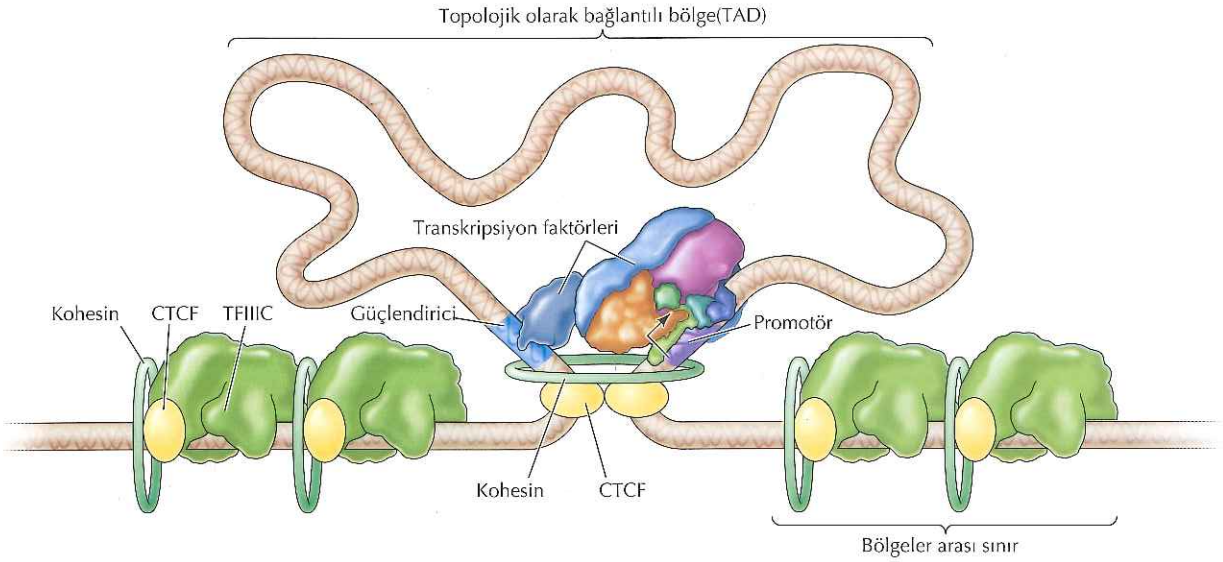
Güçlendiriciler sadece transkripsiyon faktörleri için bağlanma yerleri olarak değil, aynı zamanda bu bölümde daha sonra ele alınacağı üzere kromatin yapıdaki karakteristik özellikleri ile de tanımlanabilirler. Bu karakteristik özelliklere dayanılarak yapılan global analizlerde, insan genomunda 500.000 ile 1 milyon arasında güçlendirici olduğu tespit edilmiştir. Bu tüm genomik DNA'nın %10'u veya daha fazlasına tekabül eder. Açıkça görülmektedir ki, gen sayısından çok daha fazla güçlendirici vardır ve bu durum bu regülatör elemanların biyolojik davranışı belirlemedeki önemini güçlü bir biçimde vurgular. İnsan hastalıklarıyla bağlantılı pek çok mutasyonun protein-kodlayan dizilerden ziyade güçlendirici dizileri etkilediğinin gözlemlenmesi, bu görüşü destekler niteliktedir. Herhangi bir hücre tipinde, gen düzenlenmesi için birlikte iş gören 50.000 civarında aktif güçlendirici olabileceği tahmin edilmektedir. Bu nedenle gelişmiş ökaryotlarda gen düzenlenme programı, genomdaki protein-kodlayan genlerin sınırlı sayıda olmasının düşündürdüğünden çok daha komplekstir.

DNA ilmeklenmesi her ne kadar güçlendiricilerin oldukça uzak noktalardan bile etkili olmalarını sağlıyorsa da, bir güçlendiricinin aktivitesi ona ait olan uygun hedef genin promotörüne özgüldür. Bu özgüllük, ilk olarak, kromozomları bağımsız bölgelere ayıran ve güçlendiricilerin başka bir bölgelerdeki promotörü etkilemesini engelleyen diziler olarak tanımlanmış **yalıtkanlar** tarafından sağlanmaktadır. Son yıllarda bir hücredeki farklı kromozomların birbiriyle olan etkileşim yerlerini tespit eden yeni metotların (kromozom konformasyonu yakalama veya 3C olarak adlandırılır) geliştirilmesiyle, kromatin bölgelerinin ve yalıtkanların çalışma şekillerini anlamada önemli bir ilerleme kat edilmiştir. Bu etkileşimlerin analizleri genomların, **topolojik olarak bağlantılı bölgeler** (**TAD'lar**) olarak adlandırılan, aralıklı yerleşmiş bir dizi kromozomal bölgeye bölündüğünü göstermiştir (Şekil 8.20). Buna göre, belli bir bölgedeki güçlendiriciler ile promotörler birbirleriyle sık sık etkileşirlerken, başka bölgelerdeki elemanlarla nadiren etkileşirler. İnsanlarda TAD'ların boyutu, yüz kilobazdan birkaç bin kilobaza kadar çok geniş bir aralıkta değişmektedir.

Omurgalılarda yalıtkanlara bağlanan temel protein olan **CTCF**, genom organizasyonunu düzenleyen yapısal bir protein olarak kilit bir rol oynar (bkz. Şekil 8.20). TAD'ların uç sınırları CTCF'ler için çoklu bağlanma bölgeleri içerir. Bu bölgelerin, TAD'ların kurulumuna ve güçlendiricilerin etkilerinin sınırlanmasına katkısının olduğu anlaşılmaktadır. Diğer taraftan CTCF, TAD içinde kohesinle beraber çalışarak ilmek oluşumunu teşvik eder ve güçlendirici/promotör etkileşimine olanak sağlar. CTCF'in bu belirgin etkileri, onun diğer proteinlerle olan etkileşimlerine bağlı da olabilir. Örneğin, TAD'lar arası sınırlarda TFIIIC'ye bağlanma bölgeleri açısından oldukça zengindir. Bu yüzden, CTCF ve kohesinle beraber çalışarak bu sınırların belirlenmesine katkıda bulunuyor olabilir. Memeli hücrelerinde güçlendirici/promotör etkileşimlerinin ne kadar önemli olduğu göz önüne alındığında, CTCF'nin düzenlenmesini ve uzun mesafeli kromozom etkileşimlerini koordine etmek için nasıl işlev gördüğünü anlamak, gelecekteki araştırmalar için heyecan verici bir alan olmayı sürdürecektir.

Bilgi İçin

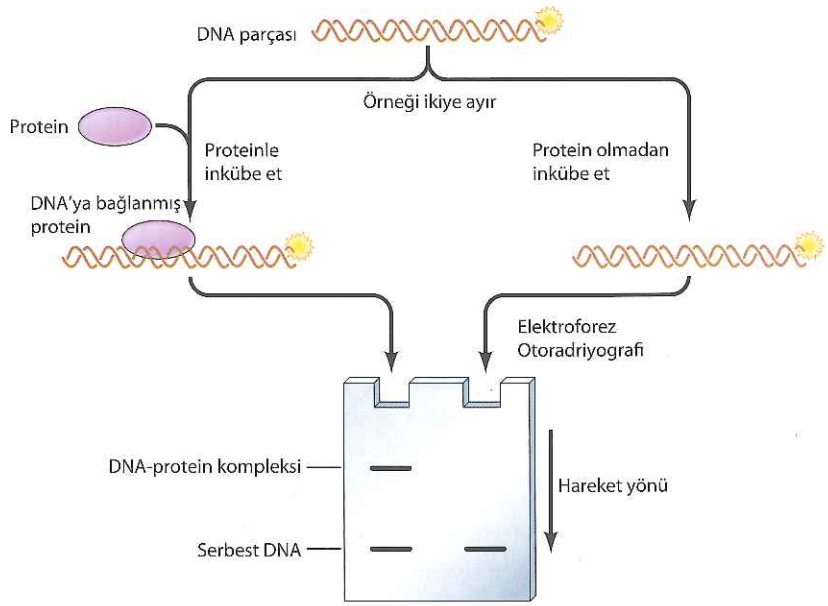
Gen terapisindeki başlıca sorunlardan biri, hücre içerisine sokulan genlerin, yakınındaki kromatinin yapısına göre, atipik olarak düzenlenmeleri veya inaktive olmalarıdır. Terapiye yalıtkan elemanların eklenmesi, bu soruna olası bir çözüm olabilir.



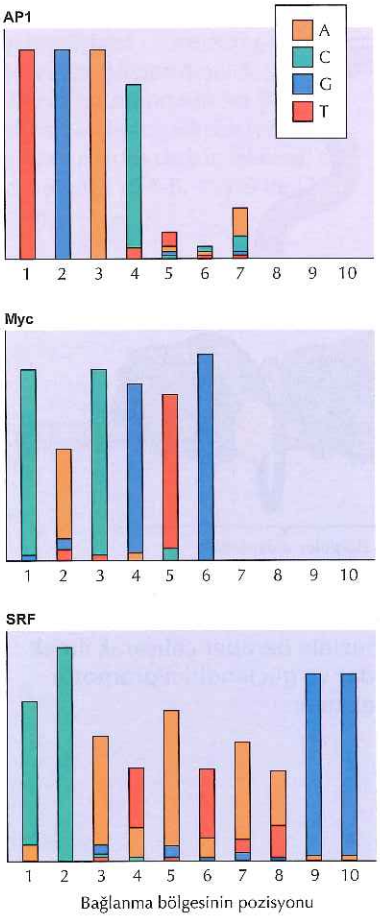
Şekil 8.20 Kromozomal Bölgeler ve CTCF Bir topolojik olarak bağlantılı bölgede (TAD) bulunan güçlendiriciler ve promotörler, birbirleriyle sık sık, ancak diğer bölgelerdeki elemanlarla nadiren etkileşirler. TAD'ların sınırları, CTCF ve TFIIIC için çoklu bağlanma bölgeleri içerir. TFIIIC, bu sınırların belirlenmesinde ve güçlendiricilerin etkilerinin sınırlanmasında görev alıyor olabilir. Bir bölge içerisinde, CTCF kohesinle beraber çalışarak ilmek oluşumunu teşvik eder ve güçlendirici/promotör etkileşimlerine olanak tanır.

Transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri

Transkripsiyon düzenleyici proteinlerin promotör veya güçlendirici dizilerdeki bağlanma bölgeleri çeşitli tip deneylerle tanımlanmıştır. Yaygın kullanılan yöntemlerden biri, radyoaktif işaretlenmiş bir DNA parçasının bir protein preparatı ile inkübe edilmesinin ardından, denatüre edici olmayan jelde elektroforeze tabi tutulduğu **elektroforetik-harekette değişim analizi**dir



Şekil 8.21 Elektroforetik-harekette değişim analizi Radyoaktif işaretli DNA parçaları içeren örnek ikiye ayrılır ve yarısı spesifik bir DNA dizisine bağlanan bir protein ile inkübe edilir. Örnekler daha sonra, proteinin DNA'ya bağlanmış olarak kalabilmesi için, denatüre edici olmayan jelde yapılan elektroforezle analiz edilir. Protein bağlanması, serbest DNA ile karşılaştırıldığında DNA-protein komplekslerinin jelde daha yavaş hareket etmeleri sayesinde saptanır. Aslında örnekteki DNA'nın sadece bir kısmı proteine bağlanır ve bu nedenle, DNA'nın proteinle inkübasyonunu takiben, DNA-protein kompleksleri ve serbest DNA'nın her ikisi de tespit edilir.



Şekil 8.22 Örnek transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri Üç memeli transkripsiyon faktörünün (AP1, Myc ve SRF) bağlanma bölgeleri, her nükleotidin sıklığının, bağlanma bölgesindeki her bir pozisyonda o nükleotide karşılık gelen harfin yüksekliği ile temsil edildiği piktogramlar şeklinde gösterilmiştir.

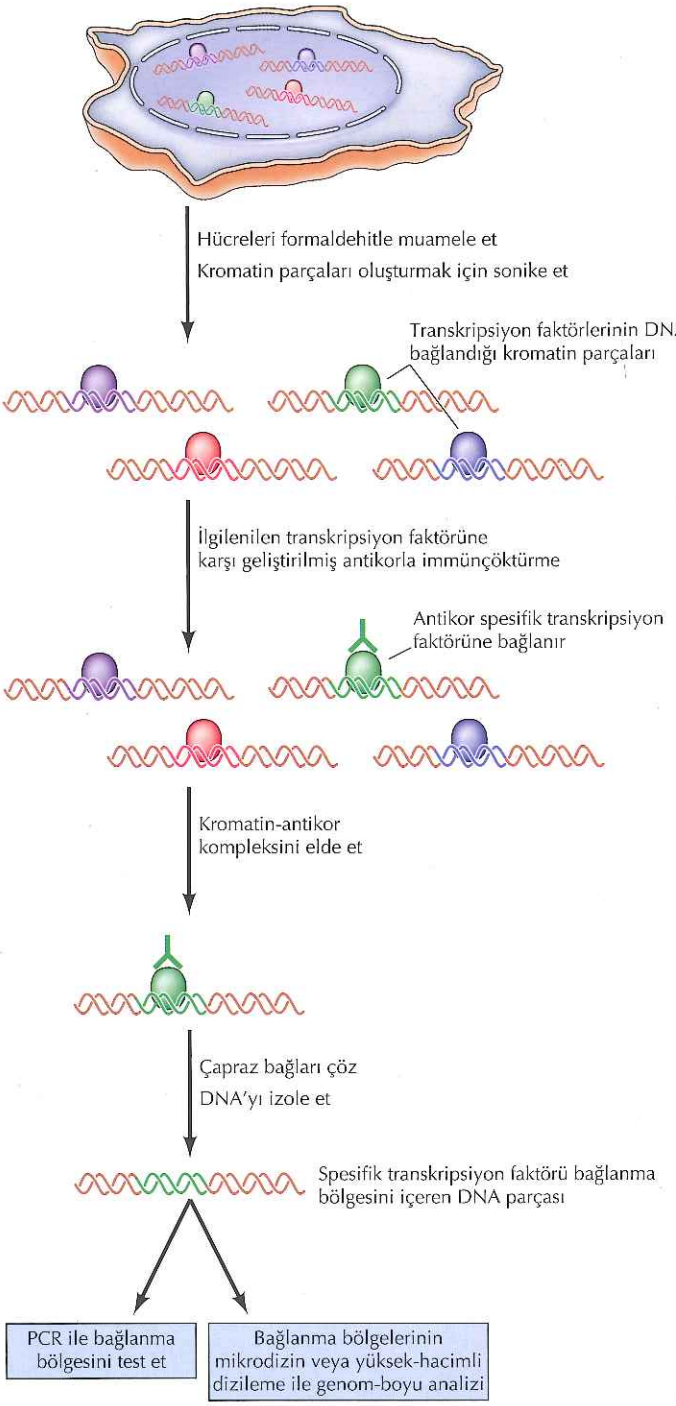
(Şekil 8.21). Bu yöntemde, protein bağlanan DNA parçasının jeldeki ilerleyişi yavaşlayacağı için, protein bağlanması elektroforetik hareketlilikte bir azalma olarak tespit edilir. Elektroforetik-harekette değişim analizlerinin ve protein-DNA etkileşimlerinin detaylı haritalanması çalışmalarının birlikte değerlendirilmesi, ökaryotik hücrelerde promotör ve güçlendiricilerin içindeki transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin karakterizasyonunu mümkün kılmıştır.

Çoğu transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesi, genellikle 6-10 baz çiftini kapsayan kısa DNA dizilerinden oluşur. Çoğu durumda bu bağlanma bölgeleri dejeneredir, bunun anlamı transkripsiyon faktörünün sadece konsensus diziye değil, konsensus diziden bir ya da daha fazla pozisyonda farklılık gösteren dizilere de bağlanabileceğidir. Bu nedenle transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri, belli bir faktör için bilinen bağlanma bölgelerinin tüm pozisyonlarında bulunan her bir bazın sıklığının belirtildiği piktogramlar şeklinde gösterilirler (Şekil 8.22). Kısa ve dejenere yapılarından dolayı, genomik DNA içinde transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri ile eşleşen diziler sıkça bulunurlar. Bu yüzden, fizyolojik olarak önemli regülatör diziler, sadece DNA dizisi kullanılarak tespit edilemezler.

Hücrede bir transkripsiyon faktörünün bağlandığı DNA bölgelerini belirlemede kullanılan diğer bir önemli deneysel yöntem **kromatin immünçöktürme** yöntemidir (Şekil 8.23). Bu teknikte, hücreler öncelikle proteinlerin DNA'ya çapraz bağlanmaları için formaldehit ile muamele edilirler. Böylelikle transkripsiyon faktörleri canlı hücrede bağlantıda oldukları DNA dizileriyle güçlü kovalent bağ kurmuş olurlar. Kromatin daha sonra hücreden dışarı çıkarılır ve yaklaşık 500 baz çiftlik parçalara ayrılır. Daha sonra, ilgilenilen transkripsiyon faktörüne bağlı olan DNA parçaları, bu transkripsiyon faktörüne spesifik antikorlarla immünçöktürme yapılarak izole edilir (bkz. Şekil 5.11). Formaldehit çapraz bağların çözülmesinin ardından immünçöktürülen DNA izole edilir ve ilgilenilen transkripsiyon faktörünün hücredeyken bağlı olduğu bölgeler belirlenir. Kromatin immünçökeltilerde ilgilenilen diziyi tespit etmek için, PCR kullanmak suretiyle transkripsiyon faktörünün kendisine spesifik olan regülatör elemana bağlanması test edilebilir (bkz. Şekil 4.22). Alternatif olarak, immünçöktürülen DNA parçalarının, yüksek-çıktılı DNA dizileme veya DNA mikrodizinlere hibridizasyon ile (bkz. Şekil 5.5 ve 5.6) genom-boyu analizi, bir transkripsiyon faktörünün hücrede bağlandığı bölgelerin tamamını tespit etmek için kullanılabilir.

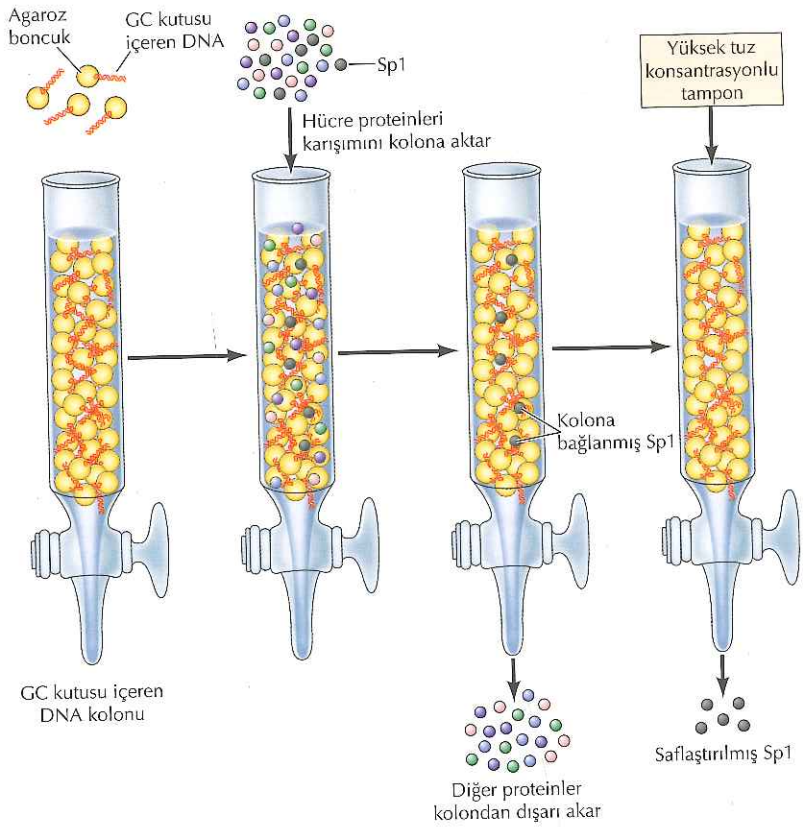
Transkripsiyon düzenleyici proteinler

Transkripsiyon düzenleyici (regülatör) proteinlerin bir çoğu, spesifik DNA dizilerine bağlanmalarına dayanılarak izole edilmiştir. Ökaryotik transkripsiyon faktörlerinin ilk örneklerinden biri, SV40 DNA'sının transkripsiyon çalışmaları sırasında, Robert Tjian ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Bu faktörün (spesifiklik proteini 1, Sp1 olarak adlandırılır) SV40 promotöründeki GC kutularına bağlanarak transkripsiyonu uyardığı bulundu (bkz. Şekil 8.16).



Şekil 8.23 Kromatin immünçöktürme Hücreler DNA ile proteinleri çapraz bağlamak için formaldehitle muamele edilirler ve daha sonra kromatin parçaları oluşturmak üzere sonike edilirler. Daha sonra kromatin parçaları spesifik bir transkripsiyon faktörüne karşı geliştirilmiş antikorla inkübe edilir ve antikora bağlı kromatin parçaları Şekil 5.11'de gösterildiği gibi toplanır. Çapraz bağlar daha sonra çözülür ve ilgilenilen spesifik transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesini içeren DNA parçalarının elde edilebilmesi için DNA izole edilir. İmmünçökeltilen parçalar, ya spesifik bir DNA dizisinin varlığını test etmek için PCR ile, ya da genom içindeki transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin tamamını tanımlamak için mikrodizinlere hibridizasyon veya yüksek-hacimli DNA dizilime gibi global metotlarla analiz edilebilir.

Sp1'in spesifik olarak GC kutusuna bağlanması sadece Sp1'in bir diziye özgül transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmasını sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda transkripsiyon faktörlerinin saflaştırılması için genel bir yaklaşım da sunmuş oldu. Önceleri bu proteinlerin izolasyonu, hücredeki miktarları çok az olduğu için (hücredeki tüm proteinlerinin sadece %0,001'i), geleneksel biyokimya yöntemleriyle başarılamayacak kadar büyük bir zorluk içeriyordu. Bu problem,



Şekil 8.24 Sp1'in DNA-afinite kromatografisi ile saflaştırılması Tekrarlayan GC kutusu dizileri içeren çift-zincirli oligonükleotidler agaroz boncuklara bağlanır ve kolon içine aktarılır. Daha sonra Sp1 içeren hücre proteinleri karışımı kolona uygulanır. Sp1 spesifik olarak GC kutusu oligonükleotidlerine bağlandığı için kolonda tutulurken, diğer proteinler kolondan dışarı atılırlar. Kolonun yüksek tuz konsantrasyonlu bir tampon çözelti ile yıkanmasının ardından Sp1, GC kutusu DNA'sından ayrılır ve böylece saflaştırılmış Sp1 elde edilmiş olur.

Sp1'in saflaştırılmasında **DNA-afinite kromatografisi** kullanılması ile çözüldü (Şekil 8.24). GC kutusu dizisine karşılık gelen çok sayıda oligonükleotidin kopyası, katı bir kolon dolgu maddesine bağlandı ve hücre özütleri bu kolonun içinden geçirildi. Sp1 GC kutusuna yüksek afinite ile bağlandığı için, spesifik olarak kolon üzerinde tutunurken, diğer proteinler tutunamaz. Böylece yüksek derecede saflaştırılan Sp1 elde edilebildi ve daha sonraki çalışmalar için kullanılabildi.

İlk olarak Sp1'in saflaştırılması için optimize edilen DNA-afinite kromatografisi yöntemi, ökaryotik hücrelerden diziye-özgül DNA'ya bağlanan proteinlerin pek çok çeşidinin izolasyonunda başarıyla kullanıldı. Diğer transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler, spesifik DNA dizilerine bağlanan rekombinant proteinleri tanımlamak için kullanılan cDNA ekspresyon kütüphanelerinin taranmasıyla belirlendi. Transkripsiyon faktörlerinin cDNA'larının klonlanması ve dizilenmesi, bu kritik önemdeki regülatör proteinlerin yapı ve fonksiyonları hakkında bugünkü bilgi düzeyine erişmemizde büyük katkı sağladı.

Anahtar Deney

Bir Ökaryotik Transkripsiyon Faktörünün İzolasyonu

Affinity Purification of Sequence-Specific DNA-Binding Proteins

James T. Kadonaga & Robert Tjian, University of California at Berkeley, Berkeley, CA

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1986, Volume 83, pages 5889-5893.

Bağlam

1950'lerde François Jacob ve Jacques Monod tarafından yapılan lac operonu çalışmalarından itibaren artık transkripsiyonun spesifik DNA dizilerine bağlanan proteinler tarafından düzenlendiği anlaşılmıştı. Ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonu çalışmaları için kullanılan öncül sistemlerden biri, 1980'lerin başlarında birkaç düzenleyici DNA dizisi tanımlanan maymun virüsü SV40 idi. William Dynan ve Robert Tjian, 1983'de ilk kez, bu dizi elemanlarından birinin (GC kutusu), insan hücrelerinin nükleer özütlerinde bulunan bir proteinin spesifik bağlanma bölgesi olduğunu gösterdi. Bu protein (spesifiklik proteini 1, Sp1 olarak adlandırılır), sadece GC kutusu dizilerine bağlanmakla kalmayıp, aynı zamanda dizi-spesifik transkripsiyon aktivatörü olduğunu gösterir şekilde, *in vitro* transkripsiyonu da uyarmaktaydı.

Sp1'in etki mekanizmasının çalışılabilmesi için, transkripsiyon faktörünün saf olarak elde edilmesi ve sonunda Sp1 geninin klonlanması gerekli hale geldi. Böylece, saf Sp1'in izolasyonu öncelikli bir iş, fakat aynı zamanda göz korkutucu bir teknolojik zorluk olarak ortaya çıktı. Sp1 ve diğer transkripsiyon faktörleri, total hücre proteinlerinin yalnızca %0,001'ini oluşturduklarından, geleneksel biyokimyasal yöntemlerle saflaştırılamıyorlardı. James Kadonaga ve Robert Tjian, DNA-afinite kromatografisi yöntemini geliştirerek, bu problemi çözdüler. Bu yöntem, yalnız Sp1'in saflaştırılmasını sağlamakla kalmayıp, diğer pek çok ökaryotik transkripsiyon faktörünün saflaştırılmasına da yol açarak, ökaryotik hücrelerde transkripsiyonel düzenlenmesinin moleküler analizi için kapıları ardına kadar açmış oldu.

Deneyler

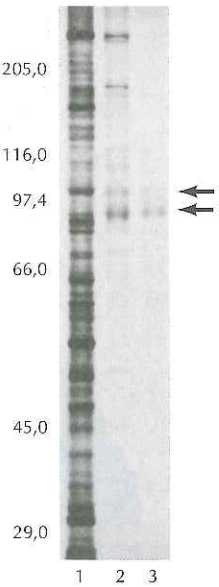
Kadonaga ve Tjian tarafından geliştirilen DNA-afinite kromatografisi metodu, Sp1'in GC kutusu dizisine (GGGCGG) spesifik ve yüksek afinite ile bağlanmasından yararlanıyordu. Bu dizinin çok sayıda kopyasını içeren sentetik oligonükleotidler katı boncuklara bağlandı ve bir ham nükleer özüt, GC kutusu DNA'sına bağlanmış boncuklar içeren bu kolondan geçirildi. Sonrasında, oligonükleotidlere spesifik olarak bağlanamamış proteinler, boncukların yıkanmasıyla uzaklaştırıldı. En sonunda, boncuklar yüksek tuz tamponu (0,5 M KCl) ile yıkanarak, Sp1'in DNA ile bağlantısı bozuldu ve böylece Sp1 kolondan serbest olarak dışarıya serbest bırakılabildi.

Jel elektroforezi, başlangıçta kolona konulan ham nükleer özütün, kompleks bir protein karışımı olduğunu gösterdi (şekle bakınız). Bunun aksine, özüt DNA- afinite kromatografisinden iki kere geçirildikten sonra, elde edilen proteinlerin yaklaşık %90'ı sadece iki polipeptide karşılık geliyordu. Bu polipeptidler, DNA'ya bağlanma ve *in vitro* transkripsiyon analizlerindeki aktivitelerine göre, Sp1 olarak tanımlandılar. Böylece, Sp1 DNA-afinite kromatografisi ile başarılı bir şekilde saflaştırılmış oldu.

Etki

Kadonaga ve Tjian, 1986'daki makallelerinde, DNA-afinite kromatografisi yönteminin, "diğer dizi-spesifik DNA'ya bağlanan proteinler için genel olarak uygulanabilir" olduğunu belirttiler. Bu öngörü daha sonra fazlasıyla doğrulanmıştır ve birçok ökaryotik transkripsiyon faktörü bu yöntemle saflaştırılmıştır. Diğer transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler ise, alternatif bir yöntemle (1988'de, Phillip Sharp ve Steven McKnight'ın laboratuarlarında birbirlerinden bağımsız olarak geliştirildi) izole edilmiştir. Bu yöntemde cDNA ekspresyon kütüphaneleri, istenilen DNA dizilerine spesifik olarak bağlanan rekombinant proteinleri saptayabilmek için, oligonükleotid problarla taranmaktadır. Dizi-spesifik DNA'ya bağlanan proteinlerin bu yöntemlerle izole edilebilmeleri, çok sayıda transkripsiyonel regülatör proteinin yapı ve fonksiyonlarının ayrıntılı olarak karakterizasyonunu sağlamış ve ökaryotik hücrelerdeki gen ekspresyonunun bugünkü düzeyde anlaşılması için bir temel teşkil etmiştir.

Robert Tjian



Sp1'in saflaştırılması. Ham nükleer özütte bulunan başlangıçtaki proteinlerin (1. kuyu) ve DNA-afinite kromatografisinden bir ya da iki kez geçirildikten sonra elde edilmiş proteinlerin (sırasıyla 2. ve 3. kuyular) jel elektroforezi. Belirteç proteinlerin büyüklükleri (kilodalton olarak), jelin sol tarafında belirtilmektedir ve Sp1 polipeptidleri oklarla gösterilmiştir.

Bilgi İçin

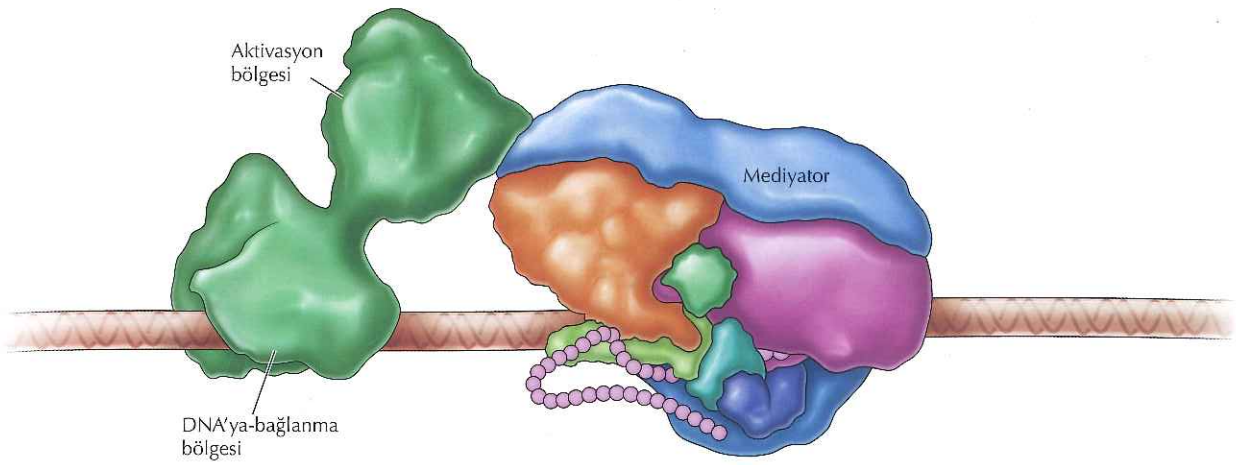
Çinko parmak bölgesi olan ve genom içerisindeki spesifik dizilere bağlanmak için tasarlanmış yapay transkripsiyon faktörleri geliştirilmektedir. Farklı efektör bölgelerini, DNA bağlanma bölgesine bağlayarak hedef gen ya aktive edilebilir yada susturulabilir. Bu teknolojinin gen tedavisinde veya transgenik hayvan ve bitkiler geliştirmede kullanılması mümkündür.

Transkripsiyon aktivatörlerinin yapısı ve fonksiyonu

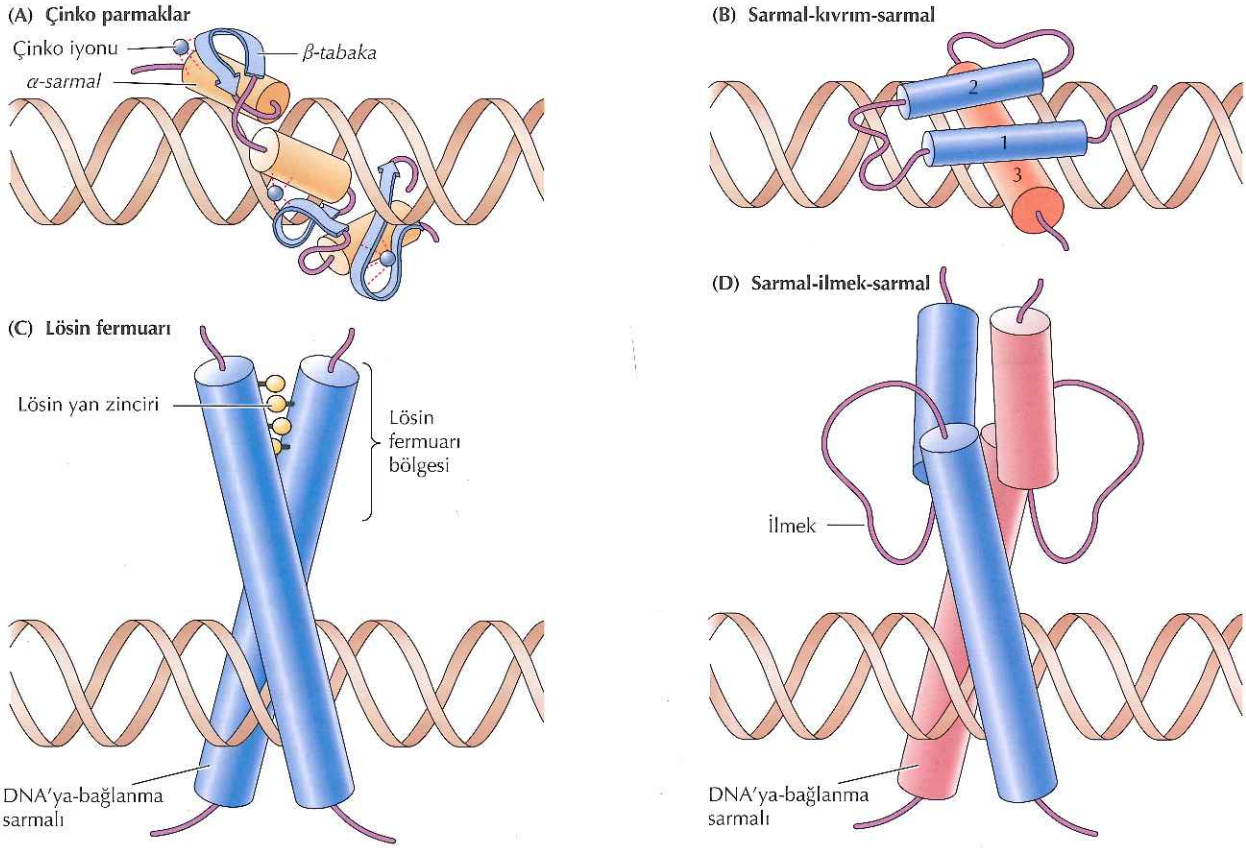
Transkripsiyon faktörleri, gen ekspresyonun düzenlenmesinde esas olduğu için, çalışma mekanizmalarının anlaşılması, hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji araştırmalarının en önemli ilgi alanlarından biridir. Bu proteinlerden en detaylı araştırılanlar, Sp1 gibi, regülatör DNA dizilerine bağlanan ve transkripsiyonu uyaran **transkripsiyon aktivatörleridir.** Bu faktörler, genellikle iki bağımsız bölgeden oluşur: Proteinin bir bölgesi spesifik olarak DNA'ya bağlanır, diğer bölge ise transkripsiyon kompleksinin Mediyatör ve öteki bileşenleri de içeren diğer proteinleriyle etkileşerek transkripsiyonu uyarır (Şekil 8.25). DNA'ya bağlanma bölgesinin temel işlevi, transkripsiyon faktörünün DNA üzerindeki doğru yere sıkıca tutunmasını sağlamaktır. Aktivasyon bölgesi ise bunu takiben bağımsız olarak, protein-protein etkileşmeleri yoluyla transkripsiyonu uyarır.

Ökaryotik hücrelerde bugüne dek birçok farklı transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır. İnsan genomunda, transkripsiyon faktörü kodlayan yaklaşık 2000 civarında gen vardır. Bu faktörler birçok farklı tipte DNA'ya-bağlanma bölgesi içerirler, bunlardan bazıları Şekil 8.26'da gösterilmiştir. En sık rastlanılan tipteki bölge, çinko iyonlarını bağlayan ve DNA'ya bağlanan ilmekli yapılar ("parmaklar") şeklinde katlanan sistein ve histidin amino asit tekrarları içeren **çinko parmak bölgesi**dir. Bu bölgeler ilk önce polimeraz III transkripsiyon faktörü TFIIIA'da tanımlanmış olsa da, Sp1'in de içinde olduğu, polimeraz II promotörlerini düzenleyen transkripsiyon faktörlerinde de yaygın olarak bulunur. Çinko parmak bölgeleri içeren diğer transkripsiyon faktörü örnekleri, östrojen ve testosteron gibi hormonlara yanıt olarak gen transkripsiyonunu düzenleyen **steroid hormon reseptörleridir.**

Sarmal-kıvrım-sarmal motifi ilk kez, *E. coli* katabolit aktivatör proteinin de (CAP) dahil olduğu, bakteriyel DNA'ya bağlanan proteinlerde tanımlanmıştır. Bu proteinlerde, sarmallardan biri DNA ile temasın çoğunu sağlarken, diğer sarmallar kompleks boyunca uzanarak etkileşimi sağlamlaştırır. Ökaryotik hücrelerde sarmal-kıvrım-sarmal proteinler, embriyonik gelişim sırasında gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik rol oynayan **homeodomeyn** proteinlerini de içerir.

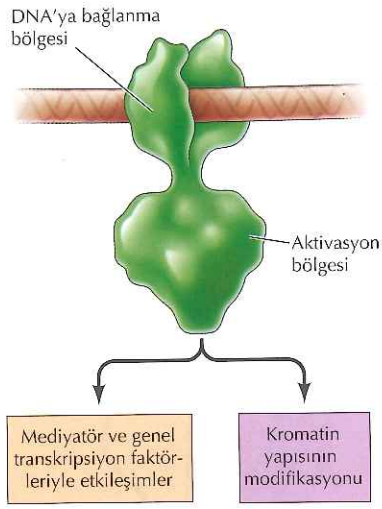


Şekil 8.25 Transkripsiyon aktivatörlerinin yapısı Transkripsiyon aktivatörleri iki bağımsız bölgeden oluşur. DNA'ya bağlanma bölgesi spesifik bir DNA dizisini tanır, aktivasyon bölgesi ise, Mediyatörle veya transkripsiyon kompleksinin diğer bileşenleri ile etkileşir.



Şekil 8.26 DNA'ya bağlanma bölgelerine örnekler (A) Çinko parmak bölgeleri, içindeki α sarmal ve β tabakanın koordine bir şekilde çinko iyonuna bağlandığı ilmeklerden oluşur. (B) Sarmal-kıvrım-sarmal bölgeleri, üç (veya bazı durumlarda dört) sarmal bölgeden oluşur. Bir sarmal (sarmal 3) DNA ile esas teması kurarken, sarmal 1 ve 2 üstte yer alır ve etkileşimi sağlamlaştırır. (C) Lösin fermuarı proteinlerinin DNA'ya bağlanma bölgeleri, iki farklı polipeptid zincirden oluşmuştur. Sarmal bölgenin bir tarafında açığa çıkmış olan lösin kalıntılarının hidrofobik yan zincirleri arasındaki etkileşimler (lösin fermuarı) dimerleşmeden sorumludur. Lösin fermuarının hemen aşağısında, bazik amino asitlerce zengin bir DNA'ya bağlanma sarmalı vardır. (D) Sarmal-ilmek-sarmal bölgeler, dimerleşme bölgelerinden her birinin bir ilmekle ayrılmış iki sarmal bölgeden oluşması dışında, lösin fermuarlara benzerler.

DNA'ya-bağlanan protein ailelerinin diğer ikisi olan **lösin fermuarı** ve **sarmal-ilmek-sarmal** proteinler, iki polipeptid zincirinin dimerleşmesiyle oluşan DNA'ya bağlanma bölgeleri içerirler. Lösin fermuarı, aralarında yedi amino asitlik uzaklık olacak şekilde yerleşmiş dört veya beş lösin kalıntı içerir ki bu durum, lösinlerin hidrofobik yan zincirlerinin sarmal bölgenin bir tarafında açıkta kalmalarına neden olur. Bu bölge, lösin yan zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşimler sayesinde iki protein alt birimini bir arada tutan bir dimerleşme bölgesi olarak işlev görür. Lösin fermuarının hemen ardından, DNA'ya bağlanan pozitif yüklü amino asitlerce (lizin ve arjinin) zengin bir bölge gelir. Sarmal-ilmek-sarmal proteinler de, her bir dimerleşme bölgesinin bir ilmekle ayrılmış iki sarmal bölgeden oluşması dışında, benzer yapıdadırlar. Lösin fermuarı ve



Şekil 8.27 Transkripsiyon aktivatörlerinin çalışma şekli Ökaryotik aktivatörler transkripsiyonu iki mekanizma ile uyarırlar: (1) Transkripsiyon kompleksinin bir araya gelmesini kolaylaştırmak ve transkripsiyonu uyarmak için Mediyatör proteinlerle ve genel transkripsiyon faktörleriyle etkileşirler. (2) Kromatin yapıyı değiştirerek transkripsiyonu kolaylaştıran koaktivatörler ile etkileşirler.

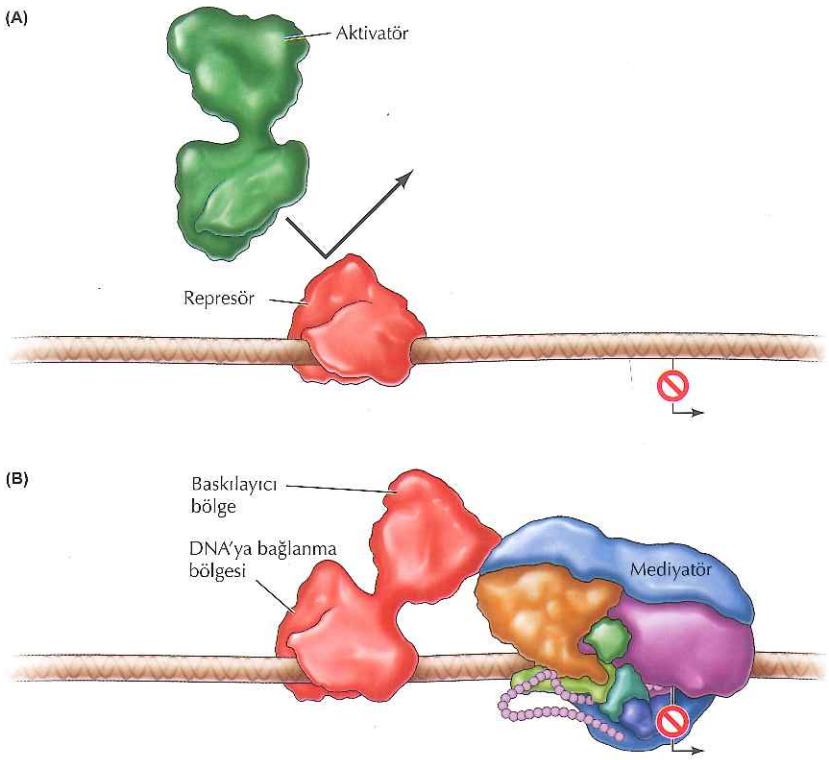
sarmal-ilmek-sarmal transkripsiyon faktörlerinin her ikisinin de önemli bir özelliği, her ailenin farklı üyelerinin birbirleriyle dimer oluşturabilmesidir. Böylelikle, farklı protein alt birimlerinin kombinasyonları, hem DNA dizisi tanıma hem de transkripsiyon uyarıcı aktivite yönünden birbirinden farklı, geniş bir transkripsiyon faktörü çeşitliliği oluştururlar. Hem lösin fermuarı hem de sarmal-ilmek-sarmal proteinler, dokuya-özgül ve uyarılabilir gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynarlar ve bu ailelerin farklı üyelerinin arasındaki dimer oluşumu, fonksiyonlarının kontrolü için çok önemli bir unsurdur.

Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon bölgeleri, DNA'ya-bağlanma bölgeleri kadar iyi karakterize edilmemiştir. Asidik aktivasyon bölgeleri olarak adlandırılan bazıları, negatif yüklü amino asitlerce (aspartat ve glutamat) zenginken, diğerleri prolin veya glutamince zengindir. Ökaryotik transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon bölgeleri, transkripsiyonu iki farklı mekanizma ile uyarır (Şekil 8.27). Bunlardan ilkinde, bakterilerdeki transkripsiyon aktivatörlerine benzer şekilde, RNA polimerazı promotör üzerine getirmek ve transkripsiyon kompleksinin promotörde toplanmasını kolaylaştırmak için, Mediyatör proteinleri ve TFIIB veya TFIID gibi genel transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girerler (bkz. Şekil 8.8). Bu bölümde daha sonra tartışılacağı üzere, ökaryotik transkripsiyon faktörleri ayrıca, kromatin yapıyı değiştirerek transkripsiyonu uyaran çeşitli **koaktivatörler** ile de etkileşirler.

Ökaryotik represörler (baskılayıcılar)

Ökaryotik hücrelerde transkripsiyon, aktivatörlerle olduğu kadar represörler ile de düzenlenir. Bakteriyel karşılıklarında olduğu gibi, ökaryotik represörler de, spesifik DNA dizilerine bağlanarak transkripsiyonu inhibe ederler. Bazı durumlarda, ökaryotik represörler basit bir şekilde sadece diğer transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını engellerler (Şekil 8.28A). Örneğin, represörün transkripsiyon başlangıç noktasının yakınına bağlanması, RNA polimerazın veya genel transkripsiyon faktörlerinin promotörle etkileşimini engeller ki bu, represörlerin bakterilerdeki çalışma prensibine benzerdir. Diğer represörler, spesifik regülatör dizilere bağlanmak için aktivatörler ile yarışırlar. Bazı bunun gibi represörler, aktivatörle aynı DNA'ya-bağlanma bölgesine sahiptirler, ancak bir aktivasyon bölgesinden yoksundurlar. Sonuç olarak, represörlerin bir promotör veya güçlendiriciye bağlanmaları, aktivatörün bağlanmasını engelleyerek transkripsiyonu inhibe eder.

Basit bir şekilde aktivatör bağlanmasını engelleyen represörlerin aksine, birçok represör (aktif represörler olarak adlandırılırlar) protein-protein etkileşimleri yoluyla transkripsiyonu inhibe eden spesifik fonksiyonel bölgeler içerirler (Şekil 8.28B). Bu gibi aktif represörler, hayvan hücrelerinde çoğu durumda hücre çoğalması ve farklılaşmasında kritik düzenleyici görevler üstlenerek, transkripsiyonun düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar. Transkripsiyon aktivatörlerinde olduğu gibi, represörlerde de birkaç farklı tipte baskılayıcı bölge tanımlanmıştır. Ayrıca, represörlerin fonksiyonel hedefleri



Şekil 8.28 Ökaryotik represörlerin çalışma şekli (A) Bazı represörler, aktivatörlerin regülatör dizilere bağlanmasını engeller. (B) Diğer represörler, gerek Mediyatör proteinler veya genel transkripsiyon faktörleri ile, gerekse kromatin yapıyı değiştiren korepresörlerle etkileşerek transkripsiyonu inhibe eden aktif baskılayıcı bölgelere sahiptir.

de çok çeşitlidir: Represörler transkripsiyonu spesifik aktivatör proteinlerle, Mediyatör proteinlerle, genel transkripsiyon faktörleriyle veya kromatin yapıyı değiştirerek görev yapan **korepresörler** ile etkileşerek inhibe edebilirler.

Uzamanın düzenlenmesi

Pek çok genin transkripsiyonu, başlangıç öncesi kompleksin oluşumu ve transkripsiyonun başlaması aşamasında düzenlenir (bkz. sırasıyla Şekil 8.10 ve 8.11). Ancak, transkripsiyon hem RNA polimerazın aktivitesinin doğrudan ayarlanması, hem de kromatin yapı üzerinde değişiklikler yoluyla uzama sırasında da düzenlenebilir. Uzamanın kontrol edilmesinin önemi, son yıllarda yapılan ve hem *Drosophila* hem de insan hücrelerinde çok sayıda geni, transkripsiyona başlayan ancak promotörün hemen aşağısında duraksayan, RNA polimeraz II molekülleri ile karakterize eden çalışmalarla vurgulanmıştır. Bu RNA polimerazlar, uygun sinyallere cevaben transkripsiyona devam etmek üzere adeta "hareketsiz" durumda beklerler. İlginç olarak, bunun gibi duraksayan polimerazların üzerinde bulunduğu pek çok gen, gelişim esnasında hücre dışı sinyaller tarafından düzenlenmektedir. Bu durum transkripsiyonel uzamanın kontrolünün, gelişim ve farklılaşma sırasında ne kadar önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

C-ucu bölgesindeki (CTD) serin-5'in TFIIH protein kinaz tarafından fosforillenmesinin ardından, RNA polimeraz II transkripsiyonu başlatır (**Şekil 8.29**). Başlangıcı takiben, polimeraz kısa bir RNA parçası sentezler ve genin henüz

başında, genellikle transkripsiyon başlangıç noktasının yaklaşık 50 nükleotid uzağında duraksar. Polimerazın bu noktada duraksaması, transkripsiyonun daha ileri devam etmesini engelleyen NELF (negatif uzama faktörü) ve DSIF gibi negatif regülatör faktörlerin polimeraza bağlanmaları sonucu gerçekleşir. Transkripsiyonun devam etmesi, P-TEFb (pozitif transkripsiyon uzama faktörü-b) olarak adlandırılan diğer bir faktörün işlevine bağlıdır. P-TEFb RNA polimerazın CTD'sindeki serin-2'yi olduğu kadar NELF ve DSIF'i de fosfatlayan bir protein kinaz içerir. Bu verimli uzamanın başlamasına, ilave uzama ve RNA işlenmesi faktörlerinin CTD'ye bağlanmasına yol açar.

Uzamanın kontrolünde, P-TEFb'nin komplekse katılmasının esas düzenleyici basamak olduğu ve en azından bazı transkripsiyon aktivatörlerinin P-TEFb'ye bağlandığı ve onu promotöre yönlendirdiği görülmektedir. Örneğin, duraksayan polimerazlar, insan embriyonik kök hücrelerinde transkripsiyona uğrayan genlerin %30'unda tanımlanmıştır. Bu genler, P-TEFb'ye bağlanan ve onu promotörlerinin yakınındaki bölgelere getiren transkripsiyon faktörü c-Myc tarafından aktive edilirler. Dikkat çekici bir şekilde, c-Myc aynı zamanda insan kanserlerinde önemli rol oynayan transkripsiyon faktörlerinden biridir (Bölüm 19'da ele alınacak) ve bu durum transkripsiyonel uzamanın düzenlenmesindeki önemi iyice vurgular.

Kromatin ve Epigenetik

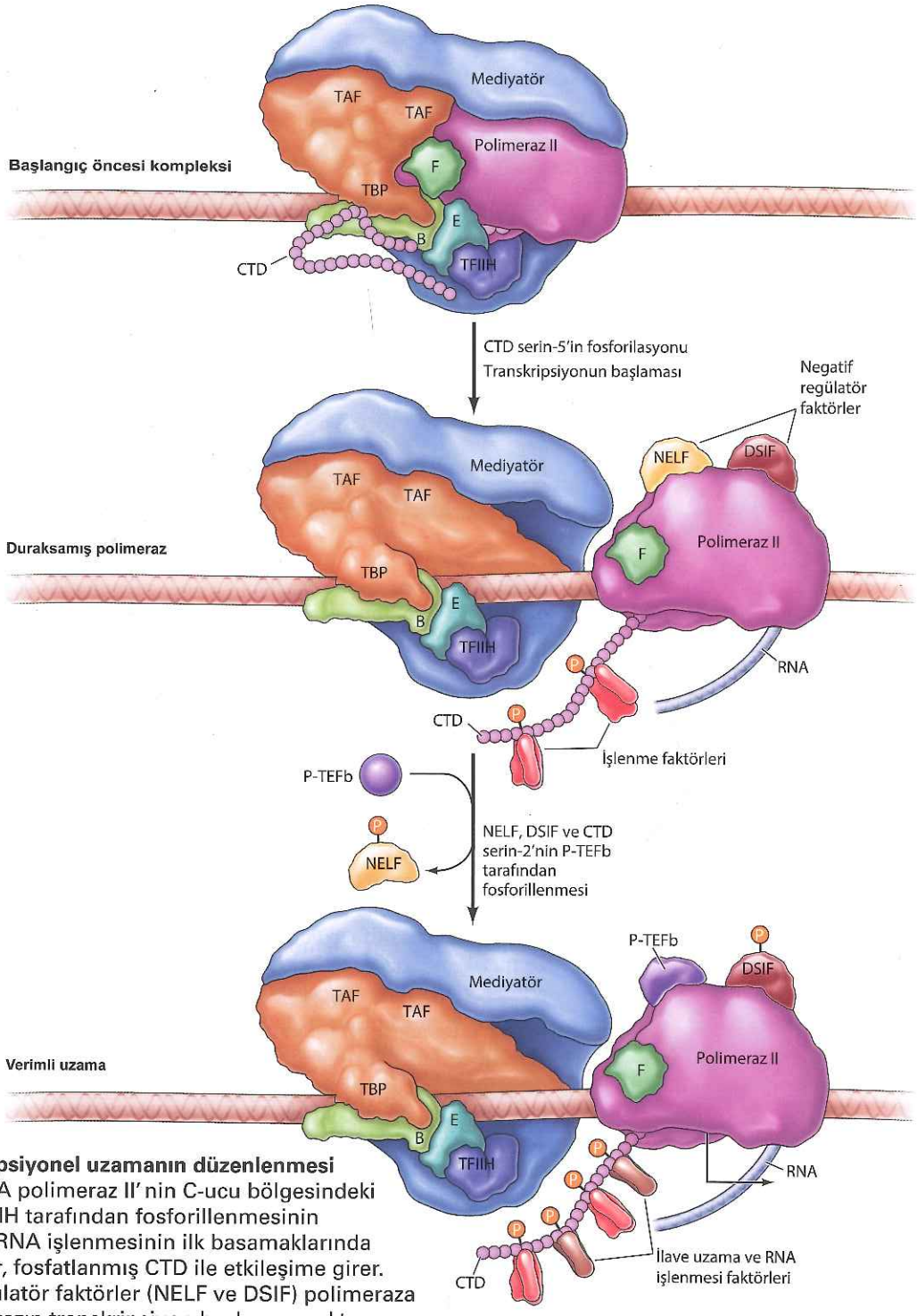
Önceki tartışmada bahsedildiği gibi, aktivatör ve represörlerin ikisi de, ökaryotlarda transkripsiyonu, yalnız Mediyatör ve transkripsiyon kompleksinin diğer bileşenleri ile etkileşerek değil, aynı zamanda kromatin yapıda indüklediği değişikliklerle de düzenlerler. Tüm ökaryotik hücrelerin DNA'sı, nükleus içerisinde çıplak olarak bulunmak yerine, histonlarla sıkıca bağlıdır. Ökaryotik DNA'nın kromatine paketlenmesi, transkripsiyon için kalıp olarak kullanılabilirliği açısından önemli sonuçlar doğurduğundan, kromatin yapı ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonunun kritik bir unsurudur. Önemli olarak, histonlar kromatinin transkripsiyonel aktivitesini etkileyen çok çeşitli şekillerde değişikliğe uğrayabilirler. Bu yüzden, histon modifikasyonu ökaryotik genlerin ekspresyonunu düzenleyen kilit bir mekanizmadır. Ayrıca, birçok histon modifikasyonu hücreler bölünürken değişime uğramadan olduğu gibi kalıtılır ve bu durum gen ekspresyon paternlerinin yavru hücrelere mitozla aktarıldığı bir mekanizma sağlar.

Histon modifikasyonları

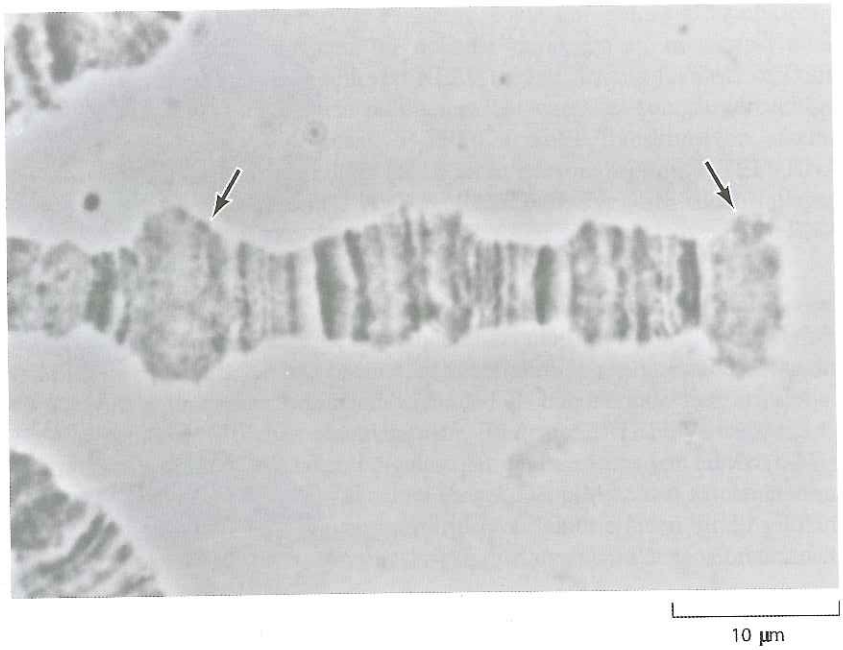
Kromatinin temel yapısal birimi nükleozomdur. Nükleozom, H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının her birinden ikişer molekül içeren bir kor partikülün etrafına sarılmış 147 baz çiftlik DNA ile, DNA'nın bu kor partiküle giriş yapan kısmına bağlı bir histon H1 molekülünden oluşur (bkz. Şekil 6.17). Kromatin daha sonra, kendi üzerinde sarmal yaparak (helezonlaşarak), büyük DNA ilmekleri oluşturmak üzere, daha üst düzey yapılara yoğunlaşır. Ökaryotik DNA'nın kromatin içinde paketlenmesi, onun transkripsiyon için kullanılabilirliğini sınırlar ve hem transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanabilmesini hem de RNA polimerazın kromatin kaplı kalıp boyunca transkripsiyon yapma yeteneğini etkiler. Aktif olarak transkribe edilen genler, transkripsiyonlarını kolaylaştıracak göreceli olarak daha az yoğunlaşmış kromatin bölgelerde bulunur (**Şekil 8.30**).

Kromatinin yapısı, hem histon modifikasyonlarıyla hem de nükleozomların yeniden düzenlenmeleriyle değişime uğrayabilir. İlk tanımlanan histon modifikasyon tipi olan **histon asetilasyonu,** çok çeşitli hücre tiplerinde,

Video 8.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v8.2
Epigenetik Mekanizmalar Gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesi, birkaç farklı tipteki kromatin modifikasyonlarını içerir.



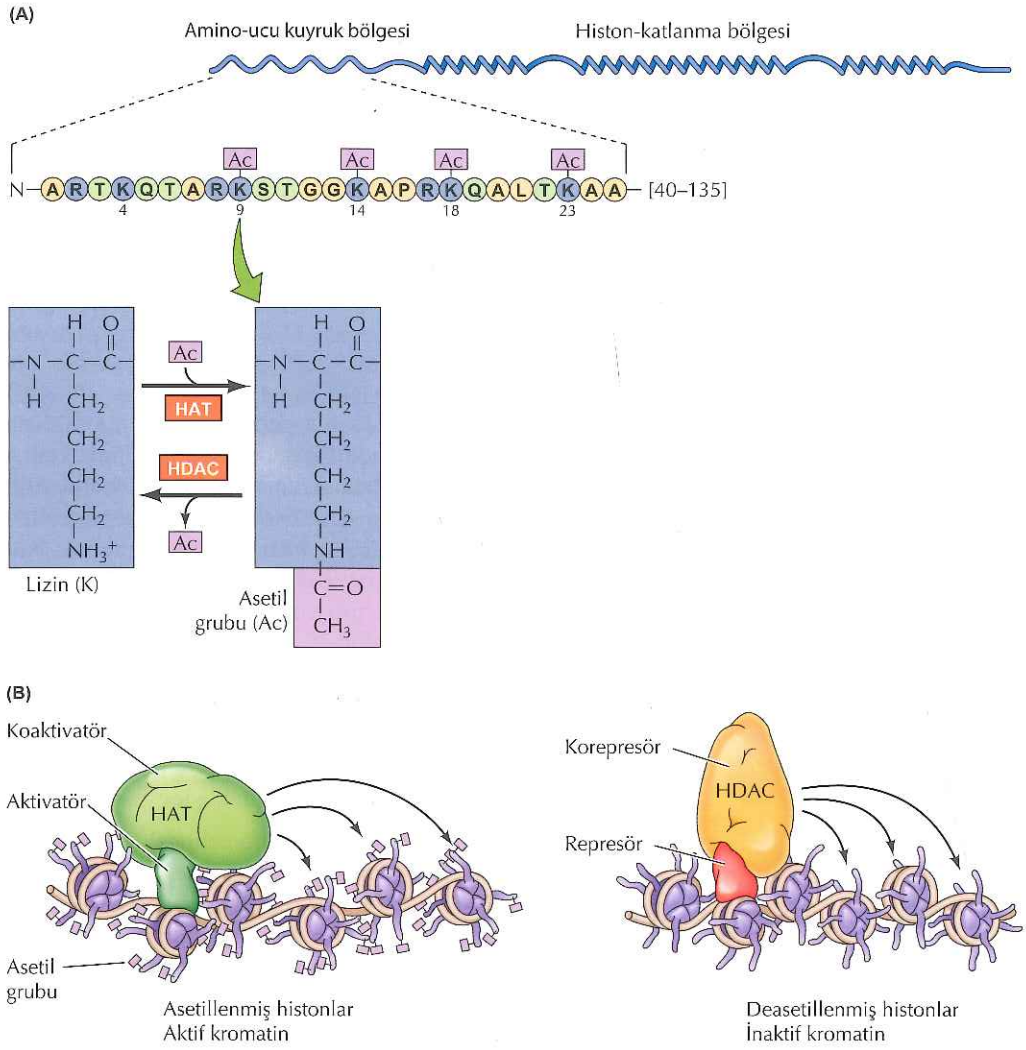
Şekil 8.29 Transkripsiyonel uzamanın düzenlenmesi Transkripsiyon, RNA polimeraz II'nin C-ucu bölgesindeki (CTD) serin-5'in TFIIH tarafından fosforillenmesinin ardından başlar. mRNA işlenmesinin ilk basamaklarında görev alan faktörler, fosfatlanmış CTD ile etkileşime girer. Ayrıca, negatif regülatör faktörler (NELF ve DSIF) polimeraza bağlanır ve polimerazın transkripsiyon başlangıç noktasının yaklaşık 50 nükleotid uzağında duraksamasını sağlar. Transkripsiyonun devam etmesi (verimli uzama), NELF, DSIF ve polimerazın CTD'sindeki serin-2'nin P-TEFb tarafından fosforillenmesi sonucu gerçekleşir. Fosforillenmiş NELF'nin kompleksten ayrılmasıyla, uzama ve RNA işlenmesi için gerekli olan ilave faktörler polimeraza bağlanırlar.



Şekil 8.30 ***Drosophila*'da daha az yoğunlaşmış (*dekondanse*) kromozom bölgeleri** Politen kromozomların, RNA sentezinde aktif olan daha az yoğunlaşmış bölgelerini (oklar) gösteren ışık mikroskobu görüntüsü. (Carnegie Enstitüsü'nden Joseph Gall'ın izni ile)

transkripsiyonel olarak aktif kromatin ile ilişkilendirilmiştir (**Şekil 8.31**). Kor histonlar (H2A, H2B, H3 ve H4), iki bölgeye sahiptir: nükleozomdan dışarı doğru uzanan bir amino-ucu kuyruk bölgesi ve diğer histonlarla olan etkileşimlerden ve DNA'nın nükleozom kor partikülünün etrafında dolanmasından sorumlu bir histon-kıvrım bölgesi. Amino-ucu kuyruk bölgeleri lizince zengindir ve spesifik lizin kalıntılarının asetilasyonu ile değişime uğrayabilirler. Bu, lizin kalıntılarının pozitif yükünü nötrleştirir ve bu sayede kromatin yapıyı gevşeterek ve transkripsiyon faktörleri ile RNA polimerazın DNA kalıbına ulaşabilirliğini arttırarak, transkripsiyonel aktivasyona katkı sağlar.

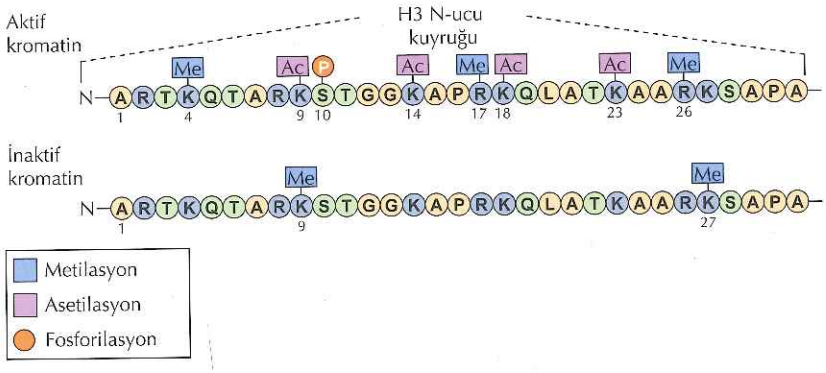
İki grup araştırmacı tarafından 1996'da yapılan çalışmalar, transkripsiyon aktivatörlerinin ve represörlerinin sırasıyla histon asetiltransferazlara ve deasetilazlara bağlandığını göstererek, histon asetilasyonu ile transkripsiyonun düzenlenmesi arasındaki direkt ilişkiyi ortaya çıkardı. Bu bağlantı ilk defa, *Tetrahymena*'nın histon asetiltransferaz kodlayan geninin klonlanması ile ortaya çıkmıştır. Beklenmedik bir şekilde, bu histon asetiltransferazın dizisi, daha önceden mayada bilinen bir transkripsiyon koaktivatörü olan Gcn5p ile yakından ilişkiliydi. Daha sonraki çalışmalar, Gcn5p'nin kendisinin de bir histon asetiltransferaz aktivitesine sahip olduğunu gösterdi ve bu durum transkripsiyonel aktivasyonun doğrudan histon asetilasyonundan kaynaklanıyor olabileceği fikrini ortaya attı. Bu bulgular daha sonra, histon asetiltransferazların, bazı memeli transkripsiyon koaktivatörleriyle ve aynı zamanda genel transkripsiyon faktörü TFIID ile ilişkili olduklarının gösterilmesiyle genişletilmiştir. Buna karşılık, hem maya hem memeli hücrelerindeki birçok transkripsiyon korepresörü, asetil gruplarını histon kuyruklarından ayırarak, histon deasetilaz işlevi görür. Sonuç olarak histon asetilasyonu, transkripsiyon aktivatörleri ve represörlerinin



Şekil 8.31 Histon asetilasyonu (A) Kor histonların nükleozomdan dışarı doğru uzanan amino-ucu kuyrukları ve nükleozomdaki DNA ve diğer histonlar ile etkileşen histon-katlanma bölgeleri vardır. Kor histonların (örn., H3) amino-ucu kuyrukları, spesifik lizin kalıntılarının yan zincirlerine asetil gruplarının (Ac) eklenmesiyle modifikasyona uğrar. (B) Transkripsiyon aktivatörleri ve represörleri, sırasıyla histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) aktivitesi gösteren koaktivatörler ve korepresörler ile bağlantılıdır. Histon asetilasyonu, aktif olarak transkribe olan kromatinin karakteristik bir özelliğidir.

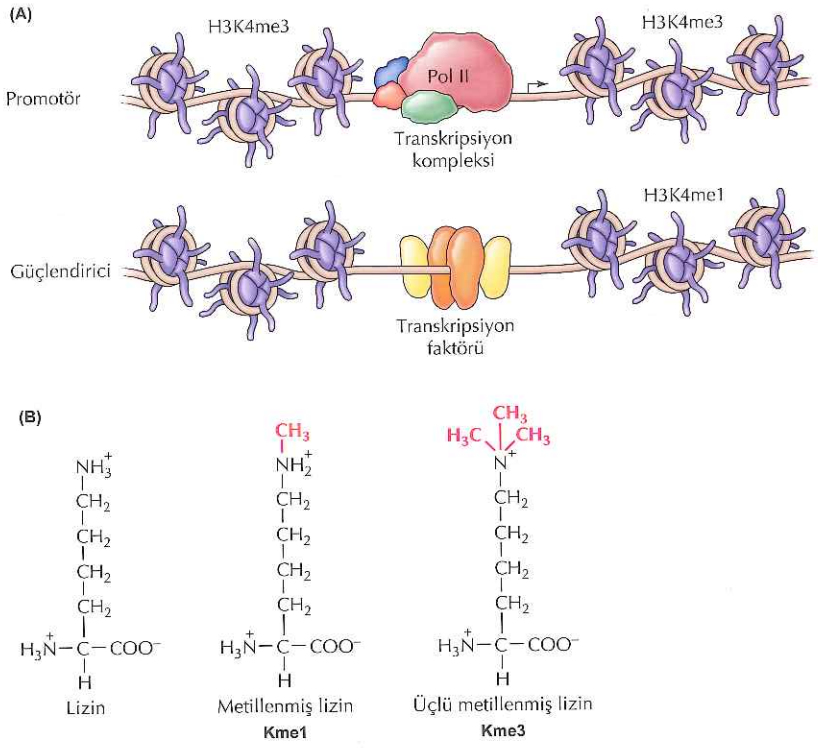
her ikisi tarafından da doğrudan hedeflenerek, ökaryotik gen ekspresyonunun düzenlenmesinde anahtar bir rol oynar.

Histonlar sadece asetilasyona değil, serin kalıntılarının fosforilasyonu, lizin ve arjininin metilasyonu ve lizin kalıntılarına küçük peptitlerin eklenmesi (Bölüm 9'da tartışılan übikitin ve SUMO) gibi başka bir takım modifikasyonlara da uğrarlar. Asetilasyon gibi bu modifikasyonlar da, histon kuyruklarındaki spesifik amino asitlerde meydana gelir ve transkripsiyonel aktivitedeki değişimlerle ilişkilidir (**Şekil 8.32**). Örneğin, transkripsiyonel olarak aktif kromatin, histon H3'teki lizin-4'ün metilasyonu, serin-10'un



Şekil 8.32 Histon modifikasyon paternleri Kromatinin transkripsiyonel aktivitesi, histon kuyruklarındaki spesifik amino asit kalıntılarının asetilasyonundan olduğu kadar metilasyonu ve fosforilasyonundan da etkilenir. Belirli histon modifikasyon paternleri, transkripsiyonel olarak aktif olan ve olmayan kromatin için karakteristiktir.

fosforilasyonu, lizin-9, 14, 18 ve 23'ün asetilasyonu, arjinin-17 ve 26'nın metilasyonunu da kapsayan bazı spesifik modifikasyonlar ile ilişkilidir. Histon modifikasyonlarının gen ekspresyonunu, hem kromatin yapının özelliklerini değiştirerek, hem de transkripsiyonu uyaran ya da baskılayan başka proteinlere bağlanma yerleri sağlayarak etkileyebildiği görülmektedir. Örneğin, lizin kalıntılarının asetilasyonu, üzerlerindeki pozitif yükü nötrleştirerek kromatin yapının gevşemesine ve böylece transkripsiyonun kolaylaşmasına neden olur. Ayrıca, transkripsiyonel aktivasyonla ilişkili diğer histon modifikasyonları gibi asetillenmiş lizinler de, transkripsiyonu uyaran çeşitli proteinler için bağlanma bölgeleri olarak işlev görebilirler.



Şekil 8.33 Promotör ve güçlendiricilerdeki kromatin (A) Promotörler ve güçlendiriciler nükleozomlardan yoksundur ve bu sayede DNA'ları transkripsiyon faktörlerinin erişimine açıktır. Promotörleri kuşatan nükleozomlar H3 lizin-4'ün üçlü metillenmiş formu (H3K4me3) ile tanımlanırlarken, güçlendiriciler bu lizinin tekli metillenmiş formu (H3K4me1) ile tanımlanırlar. (B) Tekli ve üçlü metillenmiş lizinin yapıları.

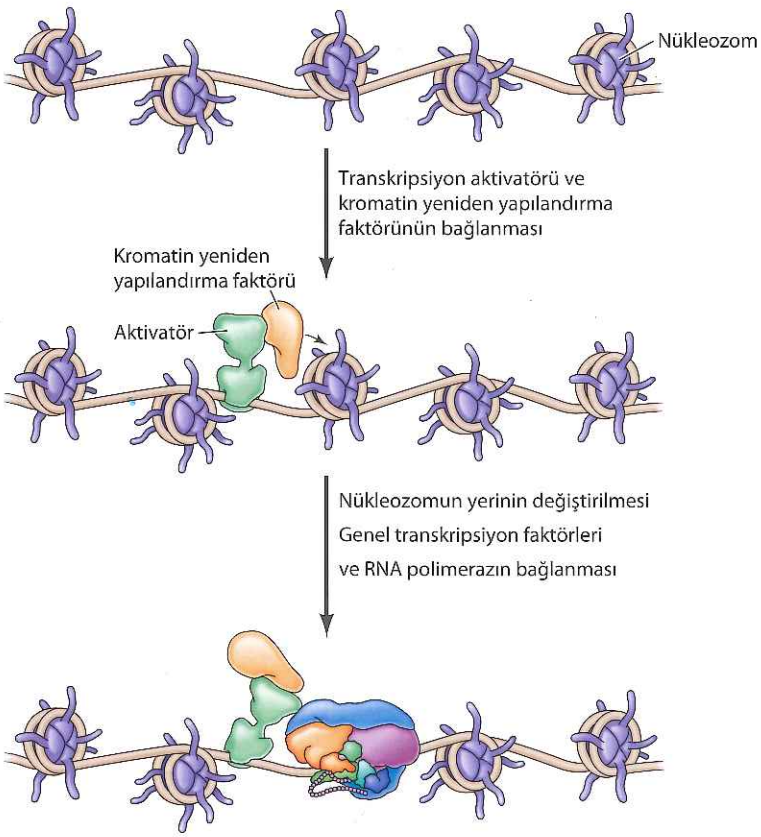
Aktif kromatindeki bu modifikasyonların aksine, H3'deki lizin 9 ve 27 metilasyonları baskılanma ve kromatin yoğunlaşması (*kondansasyon*) ile ilişkilidir. Bu lizin kalıntılarının metilasyonunu katalizleyen enzimler, hedef genlere korepresörler tarafından getirilirler. Metillenmiş H3 lizin-9 ve -27 rezidüleri daha sonra, kromatin yoğunlaşmasını uyaran proteinler için bağlanma bölgeleri olarak işlev görür ve böylece bu histon modifikasyonu ile transkripsiyonel baskılanma ve heterokromatin oluşumu arasındaki doğrudan bağlantı sağlanmış olur.

Promotörler ve güçlendiriciler, bu bölgelerin genomda saptanabilmeleri için kullanılmış, belirgin kromatin özelliklerle ayırt edilirler. Promotörler ve güçlendiricilerin DNA'ları transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için erişilir olsun diye nükleozom içermezler (**Şekil 8.33**). Bu nükleozomdan yoksun bölgeler, DNaz ile kesime karşı hassastır ve bu

nedenle genom içinde **DNaz'a aşırı duyarlı bölgeler** olarak tanımlanabilirler. Bu bölgeleri kuşatan nükleozomlar'daki histon modifikasyonları, promotörler ve güçlendiricilerde birbirinden farklıdır. Örneğin, promotörler H3 lizin-4'ün üçlü metillenmiş formu (H3K4me3) ile tanımlanırlarken, güçlendiriciler bu lizinin tekli metillenmiş formu (H3K4me1) ile karakterize edilirler.

Kromatin yeniden yapılandırma faktörleri

Kromatin yapısını histonları değiştirerek düzenleyen enzimlerin aksine, **kromatin yeniden yapılandırma faktörleri,** DNA ile histonlar arasındaki teması, ATP'nin hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanarak değiştiren protein kompleksleridir (Şekil 8.34). Kromatin yeniden yapılandırma faktörlerinin etki mekanizmalarından biri, transkripsiyon faktörlerinin spesifik DNA dizilerine erişimini sağlamak için, histon oktomerlerinin DNA molekülü üzerinde kaymasını katalizlemek ve nükleozomları böylece yeni pozisyonlarına getirmektir. Alternatif olarak, kromatin yeniden yapılandırma faktörleri, nükleozom konformasyonunun değişimine neden olarak da, spesifik DNA dizilerinin transkripsiyonu düzenleyen proteinlerle etkileşmesini sağlayabilirler. Son olarak, kromatin yeniden yapılandırma faktörleri, histonları DNA'dan dışarı atarak nükleozom içermeyen bölgeler yaratabilir ki, güçlendiriciler ve



Şekil 8.34 Kromatin yeniden yapılandırma faktörleri Kromatin yeniden yapılandırma faktörleri, nükleozomların dizilişini ve yapısını değiştirirler. Örneğin, bir transkripsiyon aktivatörüne bağlı olarak promotöre getirilen bir kromatin yeniden yapılandırma faktörü, buradaki nükleozomların yerini değiştirerek genel transkripsiyon faktörleri ve RNA polimerazın kromatine bağlanmasını kolaylaştırabilir.

promotörlerde böyle bölgeler yaygın bir şekilde bulunur (bkz. Şekil 8.33). Histon modifikasyonlarına neden olan enzimlere benzer şekilde, kromatin yeniden yapılandırma faktörleri de transkripsiyon aktivatör veya represörlerine bağlanarak DNA'ya getirilebilir ve nükleozomların dizilişini değiştirerek transkripsiyonu uyarabilir veya engelleyebilirler.

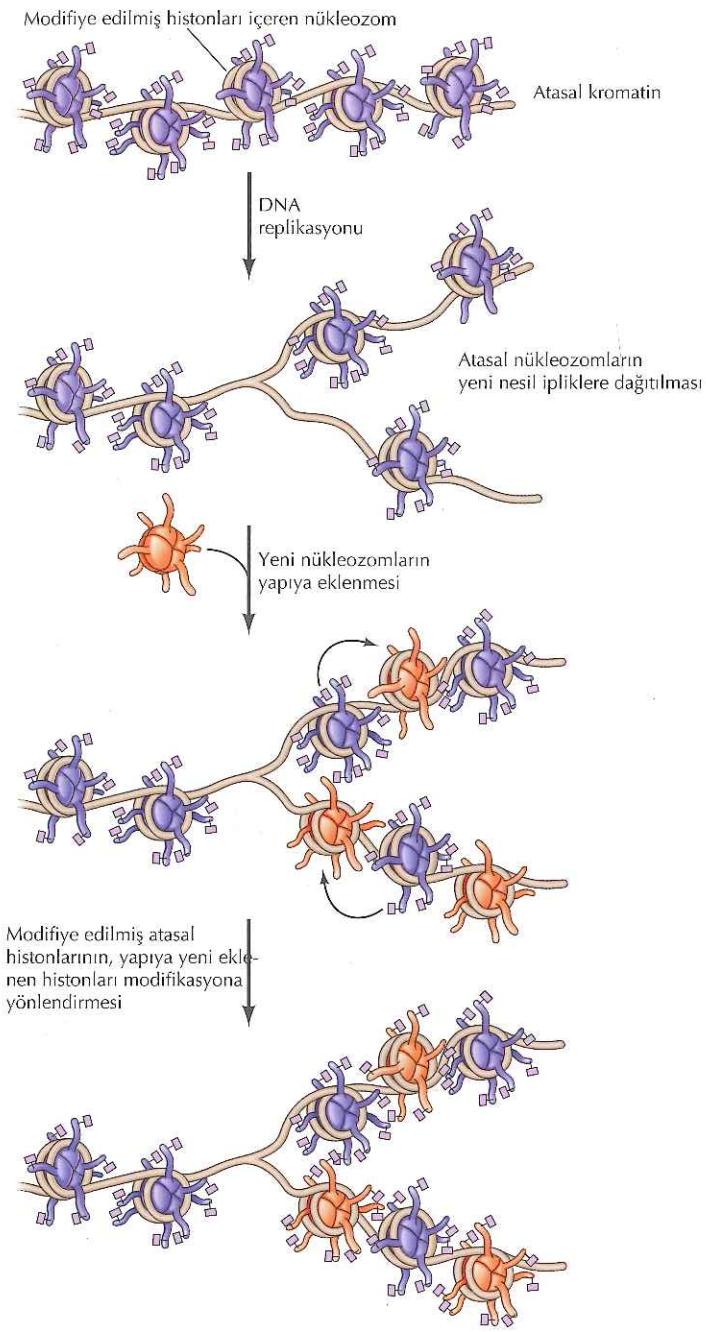
Histon modifiye eden enzimlerin ve kromatin yeniden yapılandırma faktörlerinin transkripsiyon aktivatörleri tarafından DNA'ya getirilmesi, güçlendirici ve promotör bölgelerde kromatin yapısını değiştirerek transkripsiyonun başlamasını uyarır. Ancak, transkripsiyonun başlamasını takiben, RNA polimeraz hala kromatin kalıp boyunca transkripsiyonu devam ettirebilme sorunu ile karşı karşıyadır. Bu sorun, verimli uzama başladığında, RNA polimeraz II'nin fosfatlanmış C-ucu bölgesine bağlanan **uzama faktörleri** ile kolaylaştırılır (bkz. Şekil 8.29). Bu uzama faktörleri, histon modifiye eden enzimlerin (örn. histon asetilazlar) ve transkripsiyon esnasında geçici olarak nükleozomların yerini değiştiren kromatin yeniden yapılandırma faktörlerinin her ikisini de içerir.

Histonlar ve epigenetik kalıtım

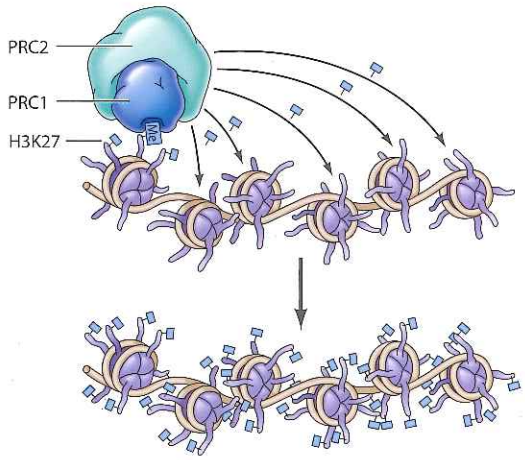
Histon kuyruklarının modifikasyonunun önemli bir özelliği, modifiye olan histonların kendilerinin histon modifikasyonunu katalizleyen proteinler için bağlanma bölgesi olarak işlev görmesidir. Böylelikle histon modifikasyonları karşılıklı olarak birbirlerini düzenleyerek, kararlı kromatin modifikasyon paternlerinin oluşmasına yol açar. Sonuç olarak, histon modifikasyonu **epigenetik kalıtım** için bir mekanizma sağlar. Epigenetik kalıtım, DNA dizisinde olmayan bir bilginin hücre bölünmesi sırasında yavru hücrelere aktarılmasıdır. Bu çok hücreli organizmaların gelişimi esnasında, her hücre tipine özgü farklı gen ekspresyon programlarının mitozla yavru hücrelere aktarılabilmesi için bir mekanizma sağladığından, farklılaşmış hücre tiplerinin devamlılığı ve korunmasında çok önemlidir. Bölüm 6'da anlatıldığı gibi, kromozomal DNA replikasyonu sırasında atasal nükleozomlar, oluşan iki yeni iplik arasında paylaştırılırlar. Sonuç olarak, modifiye edilmiş histonlar, atasal kromozomdan, oluşan iki yeni kromozoma transfer edilirler (**Şekil 8.35**). Bu modifiye edilmiş histonlar daha sonra, yeni sentezlenen histonları da benzer şekilde modifikasyon geçirmeye yönlendirirler. Bu sayede aktif olan veya olmayan kromatine özgü histon modifikasyon paternlerinin devamlılığı sağlanmış olur.

Bu konuyla ilgili iyi bir örnek olarak, *Drosophila* gelişimi sırasında hücre kaderini belirleyen anahtar düzenleyici genlerin baskılanması verilebilir. Gelişen embriyonun spesifik bazı hücrelerinde bu genler bir kere baskılandığında, bu baskılanma daha sonraki pek çok hücre bölünmesi yoluyla yavru hücrelere de aktarılır. Bu baskılanmanın embriyonik hücre bölünmeleri boyunca devamlılığı, H3 lizin 27'nin **Polikomb proteinleri** tarafından metillenmesinin bir sonucudur (**Şekil 8.36**). Polikomb proteinleri, Polikomb Baskılayıcı Kompleks 1 ve 2 (PRC1 ve PRC2) olarak adlandırılan iki kompleksten oluşur. PRC2'deki proteinlerden biri H3 lizin 27'yi metilleyen bir enzimken, PRC1'deki proteinlerden biri metillenmiş olan H3 lizin 27'ye bağlanır. H3 lizin 27 metilasyonu bu sayede bitişik komşu nükleozomlara yayılır ve hücreler bölünürken de bu patern korunmuş olur. Böylelikle ana hücrede bu kromatin işareti ile baskılanmış olan genler, yavru hücrelerde de baskılanmış olarak kalmaya devam ederler.

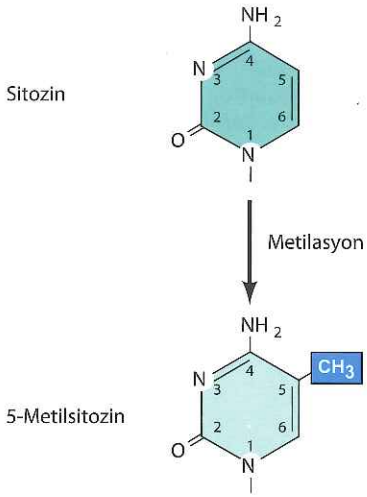
H3 lizin 27 metilasyonunu da içeren bazı histon modifikasyonları ile karakterize edilen kromatin bölgeleri arasındaki sınırlar, daha önce tartışıldığı gibi, güçlendirici ve promotörlerin işlevlerini sınırlandıran topolojik bağlantılı bölgelerle (TAD'lar) ilişkilendirilmişlerdir (bkz. Şekil 8.20). Örneğin, H3 lizin



Şekil 8.35 Histon modifikasyonlarının epigenetik kalıtımı Modifiye edilmiş histonları içeren ana zincire ait nükleozomlar, DNA replikasyonu sırasında yavru ipliklerin her ikisine de dağıtılır. Modifiye edilmiş atasal histonlar daha sonra, yeni nesil kromozomların yapısına eklenen yeni sentezlenmiş histonları da benzer modifikasyonlardan geçmeleri için yönlendirebilir.



Şekil 8.36 Polikomb proteinleri Polikomb Baskılayıcı Kompleks (PRC) 1, metillenmiş H3 lizin 27'ye (H3K27) bağlanır ve PRC2 bitişik komşu nükleozomların lizin 27 kalıntılarını metiller. Böylelikle PRC1 ve PRC2 kompleksi H3 lizin 27 metilasyonunu komşu nükleozomlara yayar.



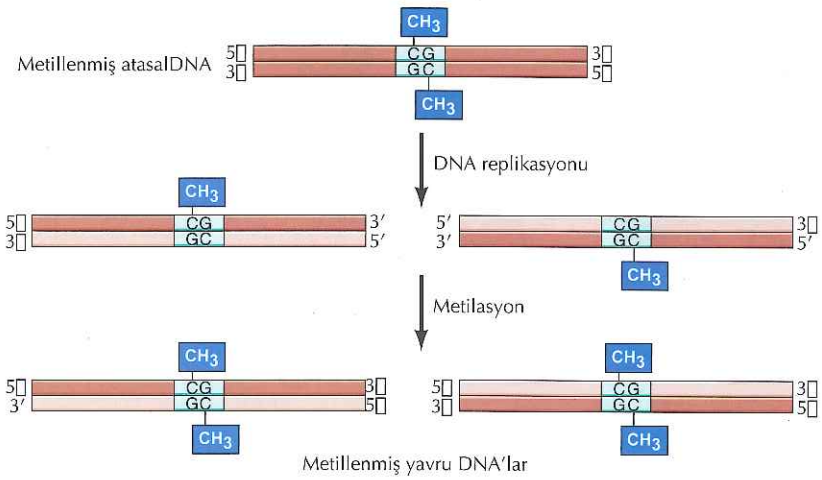
Şekil 8.37 DNA metilasyonu DNA'daki sitozin kalıntılarının 5. karbon pozisyonuna bir metil grubu eklenir.

27 metilasyonu ile karakterize edilen baskılanmış kromatin bölgeleri sıklıkla, bitişikteki transkripsiyonel olarak aktif kromatin bölgelerinden CTCF bağlanma bölgeleri ile ayrılırlar. Dolayısıyla CTCF yapısal proteini TAD'ların sınırlarını belirlemenin yanı sıra, kromatin modifikasyonu bölgelerinin de sınırlarının belirlenmesinde rol oynuyor olabilir.

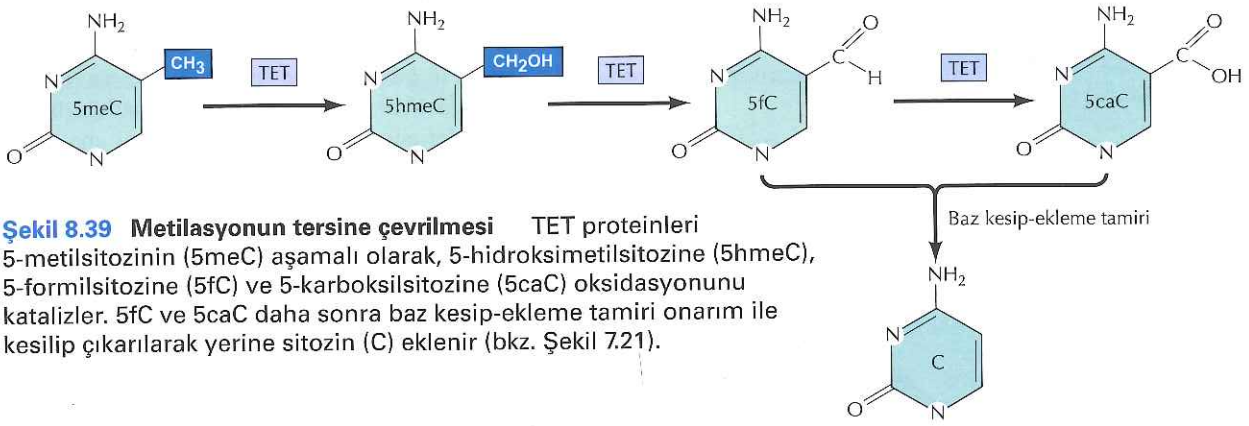
DNA metilasyonu

DNA'nın metilasyonu, ökaryotlarda transkripsiyonun epigenetik kontrolü için diğer bir genel mekanizmadır. Mantar, bitki ve hayvanların DNA'sındaki sitozin kalıntıları, 5. karbon pozisyonuna metil gruplarının eklenmesiyle değişime uğrayabilirler (Şekil 8.37). DNA spesifik olarak, zincirde guaninlerden (G) önce gelen sitozinlerden (C) (CpG dinükleotidler) metillenir ve bu metillenme transkripsiyonun baskılanmasıyla ilişkilidir. Metilasyon yaygın olarak transpoze olabilen elemanlarda gerçekleşir ve görünen odur ki metilasyon, transpozonların genom içindeki hareketlerinin baskılanmasında kilit bir rol oynamaktadır. Ayrıca DNA metilasyonu, kromatin yapı değişimleri ile uyum içinde çalışarak, gelişim ve farklılaşmada görev alan memeli genlerinin transkripsiyonel olarak baskılanması ile yakından ilişkilidir.

DNA metilasyonu, histonların modifikasyonu gibi epigenetik kalıtımın önemli bir mekanizmasıdır. DNA replikasyonunu takiben DNA metilasyon paternleri, metillenmiş atasal ipliğe hidrojen bağı ile bağlı yavru ipliğin CpG dizilerini spesifik olarak metilleyen bir enzim sayesinde, değişmeden korunurlar (Şekil 8.38). Dolayısıyla, bir atasal hücrede metillenmiş ve baskılanmış olan bir gen, yavru hücrelerde de metillenmiş ve baskılanmış olarak kalmaya devam eder. Metilasyon aynı zamanda TET ailesi enzimleri tarafından tersine de döndürülebilir. TET enzimleri 5-metilsitozinin, 5-formilsitozine ve 5-karboksilsitozine oksidasyonunu katalizler ve bu son iki ürün daha sonra DNA tamiri ile kesilip atılır ve yerine sitozin konur (Şekil 8.39). Dolayısıyla, metilasyon epigenetik olarak kalıtılabildiği gibi, aktif olarak tersine de çevrilebilir.



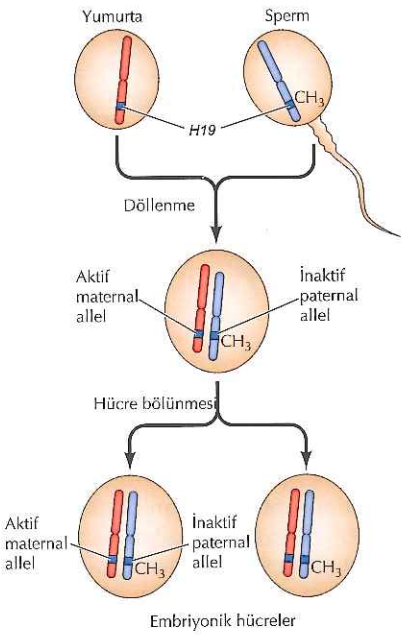
Şekil 8.38 Metilasyon paternlerinin korunumu Atasal DNA'da, her iki iplik de komplementer CpG dizilerinden metillenmiştir. Replikasyonu takiben, her yeni molekülde sadece atasal iplik metillenmiş durumdadır. Yeni sentezlenen yavru iplikler daha sonra, bir metilasyon bölgesinin karşısındaki CpG dizilerini spesifik olarak tanıyan bir enzim tarafından metillenirler.



Şekil 8.39 Metilasyonun tersine çevrilmesi TET proteinleri 5-metilsitozinin (5meC) aşamalı olarak, 5-hidroksimetilsitozine (5hmeC), 5-formilsitozine (5fC) ve 5-karboksilsitozine (5caC) oksidasyonunu katalizler. 5fC ve 5caC daha sonra baz kesip-ekleme tamiri onarım ile kesilip çıkarılarak yerine sitozin (C) eklenir (bkz. Şekil 7.21).

DNA metilasyonunun önemli bir diğer düzenleyici rolü, memeli embriyosunun gelişiminde görevli bazı genlerin ekspresyonunu kontrol eden ve **genomik damgalanma** (*genomic imprinting*) olarak bilinen bir olayla ortaya konmuştur. Diploid hücrelerde, çoğu durumda, bir genin hem anneden (maternal) hem de babadan gelen (paternal) allelleri eksprese olur. Ancak, ekspresyonları anneden mi yoksa babadan mı kalıtılmış olduklarına bağlı olan bazı damgalanmış genler (fare ve insanda yaklaşık 75 tane tanımlanmıştır) vardır. Bazı durumlarda, damgalanmış genin sadece paternal alleli eksprese edilir ve maternal allel transkripsiyonel olarak aktif değildir. Diğer damgalanmış genler içinse, sadece maternal allel eksprese edilir ve paternal allel aktif değildir.

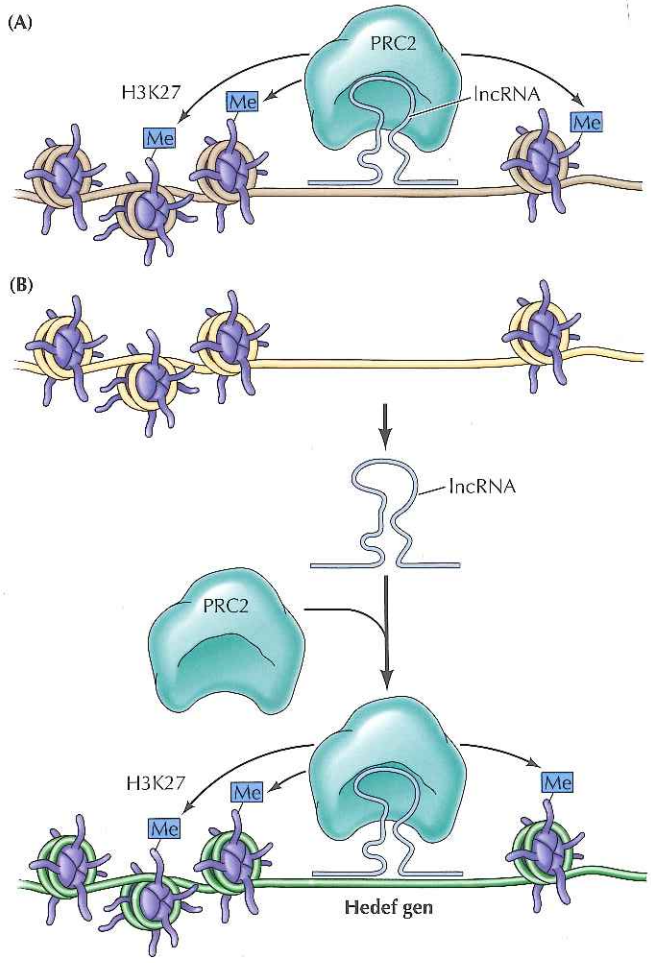
DNA metilasyonunun, damgalanmış genlerin maternal ve paternal allellerini ayırt etmede kilit bir rol oynadığı anlaşılmaktadır. Yalnız maternal kopyadan transkribe edilen *H19* geni buna iyi bir örnektir (Şekil 8.40). *H19* geni, erkek eşey hücrelerinin gelişimi sırasında spesifik olarak metillenirken, dişininkilerde metillenmez. Bu nedenle döllenmede yumurta ve spermin birleşmesiyle, bu genin metillenmiş paternal ve metillenmemiş maternal allellerini taşıyan bir embriyo oluşur. Paternal *H19* alleli, embriyonik hücrelerde ve somatik dokularda metillenmiş ve transkripsiyonel olarak inaktif şekilde kalır. Ancak, paternal *H19* alleli, eşey hattında demetile olur ve bu sayede gelecek kuşağa aktarım için yeni bir metilasyon paterninin oluşturulmasına izin verir. İlginçtir ki *H19*, diğer damgalanmış genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir kodlamayan uzun RNA (lncRNA) kodlar.



Şekil 8.40 Genomik damgalanma *H19* geni, erkek eşey hücrelerinin gelişimi sırasında spesifik olarak metillenir. Bu yüzden, sperm metillenmiş bir *H19* alleli ve yumurta metillenmemiş bir allel içerir. Döllenme ve sonrasındaki hücre bölünmelerini takiben, paternal allel metillenmiş ve transkripsiyonel olarak inaktif kalır. Dolayısıyla, embriyoda eksprese edilen sadece metillenmemiş maternal alleldir.

Kodlamayan RNA'lar

Son zamanlardaki bir dizi gelişme, mikroRNA'ları (miRNA'lar) ve **kodlamayan uzun RNA'ları (lncRNA'lar)** içeren, kodlamayan RNA'ların gen düzenlenmesindeki önemini iyice vurgulamıştır. miRNA'lar (20-30 nükleotid uzunluğunda) protein sentezini (translasyon) inhibe etmek veya homolog mRNA'ların yıkımını indüklemek amacıyla genellikle RNA



Şekil 8.41 lncRNA'ların çalışma şekli (A) lncRNA'ların çoğu, Polycomb Baskılayıcı Kompleks 2 (PRC2)'yi transkripsiyon bölgelerine getirerek H3 lizin 27 (H3K27)'nin metilasyonuna ve böylece komşu genlerin baskılanmasına neden olurlar. (B) Bazı lncRNA'lar, ya homolog DNA dizilerine ya da DNA-ya bağlanan proteinlere (örn., transkripsiyon faktörleri) bağlanıp, kromatin-modifiye edici kompleksleri (örn., PRC2) uzaktaki hedef genlere getirerek trans-etkili çalışırlar.

interferens yolağı (bkz. Şekil 4.38) üzerinden işlev görürler. Transkripsiyon-sonrası düzeydeki bu gen düzenlenmesi bu bölümde daha ileride ve Bölüm 9'da tartışılacaktır. Bölüm 6'da ele alındığı üzere, insan hücrelerinde transkripsiyonun global analizleri, gen düzenlenmesinde lncRNA'ların (>200 nükleotid) rolleri üzerine de odaklanmıştır. İnsan genomunda 50.000'den fazla lncRNA kodludur. Bu beklenmedik biçimde yüksek sayıdaki lncRNA'ların büyük çoğunluğunun fonksiyonu halen belirlenmemiş olsa da, lncRNA'ların en azından önemli bir fonksiyonlarının, transkripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunu düzenlenmek olduğu anlaşılmaktadır.

Birçok lncRNA kromatini modifiye eden proteinlerle kompleks oluşturur ve bu kromatin-modifiye edici komplekslerin transkripsiyon bölgelerine getirilmelerini sağlayarak yakın komşu genlerin ekspresyonlarını düzenler. Memelilerde X kromozomu inaktivasyonuna aracılık eden *Xist* lncRNA'yı (bkz. Bölüm 6) ve genomik damgalanmada görev alan birtakım lncRNA'ları (bkz. Şekil 8.40) da içeren birçok durumda, lncRNA'lar hedef genlerini Poikomb Baskılayıcı Kompleks 2 (PRC2) ile kompleks oluşturarak baskılarlar. Bu durum, histon H3 lizin 27'nin metilasyonuna ve transkripsiyonel susturulmaya yol açar (**Şekil 8.41A**). Diğer lncRNA'lar, aynı zamanda transkripsiyonel susturulmayı indükleyen histon H3 lizin 9 metilaz ile (bkz. Şekil 8.32) veya baskılayıcı DNA metilasyon paternleri oluşturan DNA metiltransferazlarla kompleks oluşturarak hedef genlerini baskılarlar. Ancak, önemli bir husus olarak, lncRNA'ların hepsi de hedef genlerinin transkripsiyonunu baskılamak için çalışmaz—bazı lncRNA'lar transkripsiyonu aktive eden histon asetilazlar ve histon H3 lizin 4'ü metilleyen enzimler gibi kromatin modifiye edici proteinlerle ilişkilidir (bkz. Şekil 8.32). Dolayısıyla, lncRNA'lar birçok farklı kromatin-modifiye edici enzimle bağlantılı olabilirler ve hedef genlerinin aktivatörleri veya represörleri olarak görev yapabilirler.

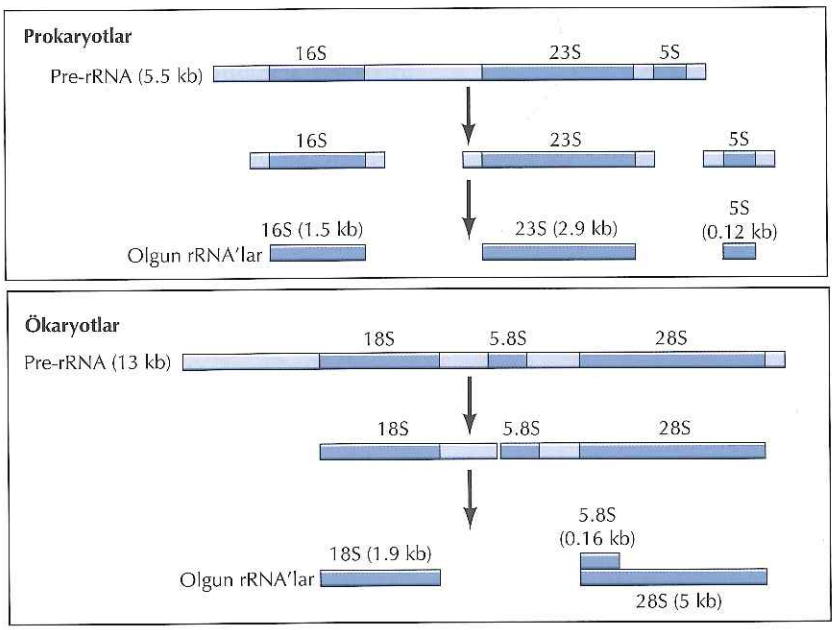
Pek çok lncRNA yakın komşu genlerin ekspresyonunu düzenlemek için kromatini modifiye eden proteinleri transkripsiyon bölgelerine getirerek *cis*-etkili çalışsa da, bazı lncRNA'lar uzaktaki hedef genlerin ekspresyonunu değiştirmek amacıyla *trans*-etkili çalışırlar (**Şekil 8.41B**). Örneğin, lncRNA *HOTAIR* insan genomunda yüzlerce geni hedef alan önemli bir gelişimsel düzenleyicidir. Bu lncRNA, hem PRC2'yi, hem de histon H3 lizin 4'ü demetile eden bir kompleksi getirerek, hedef genleri üzerinde iki baskılayıcı kromatin modifikasyonu uygulamış olur. *HOTAIR* gibi *trans*-etkili lncRNA'ların hedef genlerini bulmalarını sağlayan mekanizma henüz bilinmemektedir. Bir olasılık, lncR-

NA'ların kendi hedef DNA dizilerini homolog baz eşleşmesi ile tanıyor olabilmesidir. Diğer bir olasılık da, lncRNA'ların kendilerini spesifik DNA dizilerine taşıyacak transkripsiyon faktörleri gibi proteinlerle kompleks oluşturmaları olabilir.

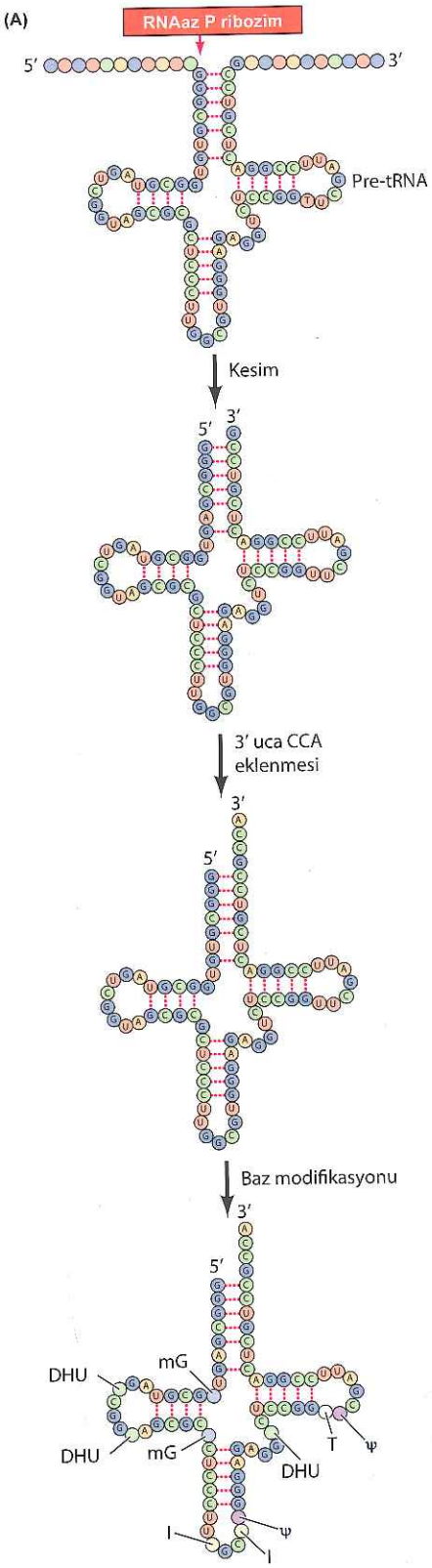
Kromatin-modifiye edici komplekslerin hedef bölgelere getirilmeleri lncRNA işleyişinde yaygın olarak kullanılan bir mekanizma olsa da, bu lncRNA'ların gen ekspresyonunu düzenleyebilmek için kullandığı tek yol değildir. Bazı lncRNA'lar transkripsiyon faktörleriyle, Mediyatörle veya bazal transkripsiyon kompleksinin bileşenleriyle (örn.TFIIB) etkileşerek transkripsiyonu düzenlerler. Yine başka lncRNA'lar, mRNA işlenmesi ve translasyonu gibi gen ekspresyonunun transkripsiyon-sonrası basamaklarını düzenleyen proteinlerle etkileşirler. Ayrıca, aktif güçlendiricilerin, güçlendirici RNA'lar (eRNA'lar *enhancer RNAs*) olarak adlandırılan kodlamayan RNA'ları oluşturmak üzere transkribe edilmeleri de kayda değer başka bir mekanizmadır. eRNA'lar normal transkripsiyonun işlevsel olmayan yan ürünlerini temsil edebilir olsalar da, yeni çalışmalar en azından bazı eRNA'ların bitişik genlerin transkripsiyonel olarak düzenlenmesinde bir rolü olabileceğini öne sürmektedir. Farklı pek çok kodlamayan RNA tipinin gen düzenlenmesindeki kapsamı ve işleyiş mekanizmaları, bugün halen aktif ve büyük ölçüde keşfedilmemiş bir araştırma alanı olarak kalmaya devam etmektedir.

RNA İşlenmesi ve Dönüşümü

Transkripsiyon, gen ekspresyonunda ilk ve en yoğun olarak düzenlenen basamak olmasına rağmen, fonksiyonel bir RNA meydana getirmek için gerekli bir seri olayın genellikle sadece bir başlangıçtır. Yeni sentezlenen RNA'ların çoğu, işlevsel formlarına dönüştürülmek için çeşitli yollarla modifiye edilmelidirler. Bakteriyel mRNA'lar birer istisnadır, çünkü transkripsiyon sırasında eş zamanlı olarak, protein sentezi için kalıp olarak kullanılırlar. Fakat hem rRNA'ların hem de tRNA'ların ilk transkriptleri, ökaryotik hücrelerde olduğu gibi bakterilerde de bir dizi aşamadan geçerek işlenirler. Benzer bir şekilde, ökaryotik mRNA'ların ilk transkriptleri, nükleustan protein sentezi için kalıp olarak kullanıldıkları sitoplazmaya taşınmalarından önce, kesip-ekleme işlemi (*splicing*) ile intronların çıkarılmasını da içeren, kapsamlı değişikliklere uğrarlar. Bu işlenme basamaklarının düzenlenmesi, hücre içindeki farklı mRNA'ların daha sonra hangi hızlarla yıkıma uğrayacaklarının düzenlenmesinde de olduğu gibi, gen ekspresyonunun kontrolünde ilave bir basamak sağlar.



Şekil 8.42 Ribozomal RNA' ların işlenmesi Bakteriler, bir pre-rRNA transkriptinin kesimi ile oluşan üç rRNA (16S, 23S ve 5S) içerirler. Ökaryotik hücreler (örn., insan hücreleri) dört rRNA'ya sahiptir. Bunlardan biri (5S rRNA) farklı bir genden transkribe edilir, diğer üçü (18S, 5,8S ve 28S) ortak bir pre-rRNA'dan türetilir. Kesimi takiben, 5,8S rRNA (ökaryotlara özgü), 28S rRNA'ya hidrojen bağı kurarak bağlanır.

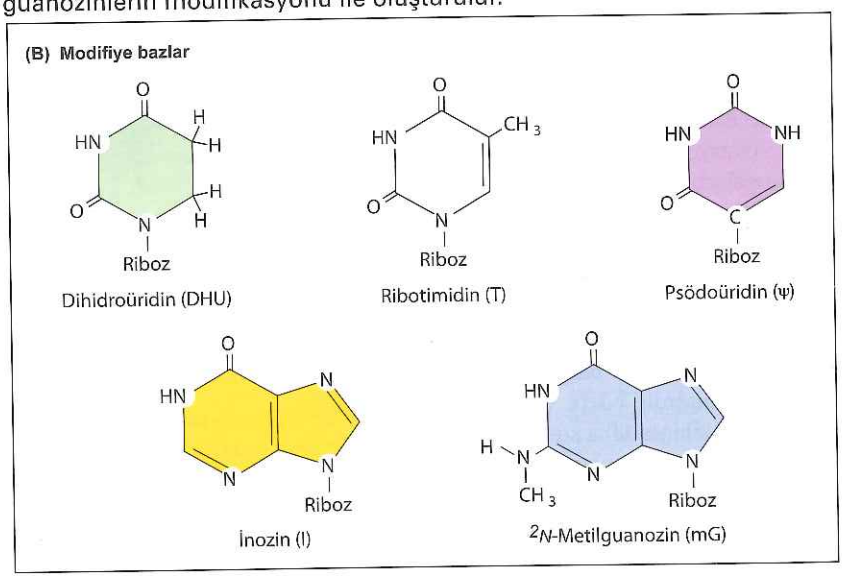


Ribozomal ve taşıyıcı RNA'ların işlenmesi

Bakterilerde ve ökaryotik hücrelerde ribozomal ve taşıyıcı RNA'ların işlenmesi, bu RNA'ların protein sentezindeki temel rolleri düşünüldüğünde bekleneceği üzere, birbirine benzerdir. Önceden tartışıldığı gibi, ökaryotlar dört çeşit ribozomal RNA'ya sahiptir (bkz. Tablo 8.1). Bunlardan üçü (5,8S, 18S ve 28S rRNA'lar) **pre-rRNA** adı verilen tek ve uzun bir öncül transkriptin kesilmesiyle oluşur (Şekil 8.42). Bakteriler, ökaryotik hücrelerin 28S, 18S ve 5S rRNA'larına eşdeğer olan, üç ribozomal RNA'ya (23S, 16S ve 5S) sahiptir ve bunlar da tek bir pre-rRNA transkriptinin işlenmesi ile oluşturulur. Kapsamlı olarak işlenmeyen tek rRNA, ayrı bir genden transkribe edilen, ökaryotlardaki 5S rRNA'dır.

Bakteriyel ve ökaryotik pre-rRNA'lar, birkaç basamakta işlenir. Bakteriyel pre-rRNA'nın ilk kesimi, üç tip rRNA için ayrı öncüller oluşturur. Bunlar daha sonra ikinci bir kesimle son ürünlere dönüştürülür. Ökaryotik hücrelerde, pre-rRNA önce, 5′ ucundaki 5,8S rRNA'ya bitişik bir bölgeden kesilerek, sırasıyla 18S ve 28S artı 5.8S rRNA içeren iki ayrı öncül ürün verir. Daha sonraki kesimler bunları son ürünlerine dönüştürür ve 5,8S rRNA 28S molekülüne hidrojen bağı kurarak bağlanır. Bu kesimlere ek olarak, rRNA işlenmesi, spesifik nükleotidlerin baz ve şeker gruplarına metil gruplarının eklenmesini ve bazı üridinlerin psödoüridinlere dönüştürülmelerini de kapsar. Ribozomal RNA işlenmesi ökaryotik hücrelerin nükleolusunda gerçekleşir ve Bölüm 10'da ayrıntılı olarak tartışılacaktır.

Şekil 8.43 Taşıyıcı RNA' ların işlenmesi (A) Taşıyıcı RNA' lar, bazıları başlı başına birkaç tRNA molekülü içeren pre-tRNA' lardan türetilir. Taşıyıcı RNA' nın 5′ ucundaki kesim RNaz P ribozimi tarafından, 3′ ucundaki kesim ise geleneksel bir RNaz proteini tarafından katalizlenir. Daha sonra, transkripsiyon-sonrası işlenme basamağında, çoğu tRNA' nın 3′ ucuna bir CCA dizisi eklenir. Son olarak, tRNA molekülünde karakteristik pozisyonlardaki bazı bazlar modifiye edilir. Bu örnekteki modifiye nükleozitler: dihidroüridin (DHU), metilguanozin (mG), inozin (I), ribotimidin (T) ve psödoüridin (ψ)' dir. (B) Modifiye bazların yapısı. Dihidroüridin, ribotimidin ve psödoüridin tRNA' daki üridinlerin modifikasyonu ile oluşturulurlar. İnozin ve metilguanozin ise guanozinlerin modifikasyonu ile oluşturulur.



Ribozomal RNA'larda olduğu gibi, bakteri ve ökaryotlardaki tRNA'lar da, bazıları birkaç özel tRNA dizisi içeren, daha uzun öncül moleküller (**pre-tRNA'lar**) olarak sentezlenirler (Şekil 8.43). Bakterilerde bazı tRNA'lar, pre-rRNA transkriptleri içinde yer alırlar. Pre-tRNA'ların 5' ucunun işlenmesi, **RNaz P** adı verilen bir enzim ile kesimi içerir ve bu bir RNA enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonun ilk örnek modeli olduğu için özel ilgi çeken bir olaydır. RNaz P, her ikisi de maksimum aktivite için gerekli olan RNA ve protein moleküllerden oluşur. 1983'de Sidney Altman ve arkadaşları, RNaz P'nin izole edilen RNA bileşeninin, pre-tRNA kesimini kendi başına katalizleyebildiğini göstermişlerdir. Bu deneyler, RNaz P'nin bir **ribozim**—katalitik aktiviteden proteinden ziyade RNA'nın sorumlu olduğu bir enzim—olduğunu ortaya koymuştur.

Taşıyıcı RNA'nın 3′ ucu, geleneksel bir protein RNaz tarafından oluşturulur, ancak tRNA molekülünün bu ucunun işlenmesi sıradışı bir aktiviteyi içerir: bir CCA ucunun eklenmesi. Tüm tRNA'lar, 3′ uçlarında bir CCA dizisine sahiptirler. Bu dizi, amino asit tutunma bölgesi olduğundan, protein sentezi esnasında tRNA fonksiyonu için gereklidir. CCA ucu, bazı tRNA genlerinin DNA'sında kodlanmış, bazılarında ise kodlanmamıştır. Bu durumda CCA ucu, bu diziye sahip olmayan tüm tRNA'ların 3′ ucunu tanıyıp buraya CCA ekleyen bir enzim tarafından bir RNA işlenmesi basamağı olarak eklenir.

Taşıyıcı RNA işlenmesinin sıradışı diğer bir yönü, tRNA moleküllerindeki bazların kapsamlı modifikasyonudur. Taşıyıcı RNA'lardaki bazların yaklaşık %10'u, tRNA moleküllerinin spesifik pozisyonlarda, çeşitli modifiye nükleotidler oluşturmak üzere değiştirilir (bkz. Şekil 8.43). Bu modifiye bazların çoğunun işlevleri bilinmemektedir, fakat bazıları tRNA molekülünün baz eşleşmesi özelliklerini değiştirerek protein sentezinde önemli roller oynarlar (bkz. Bölüm 9).

Az sayıdaki bazı canlılarda, pre-rRNA'larda olduğu gibi, bazı pre-tRNA'lar kesip-ekleme işlemi ile ortadan kaldırılan intronlar içerirler. Katalitik RNA aktivitelerini içeren diğer kesip-ekleme reaksiyonlarının aksine (mRNA işlenmesi kısmında tartışılacak), tRNA'daki kesip-ekleme işlemi bilinen klasik protein enzimlerle gerçekleşir. Pre-tRNA, intronun çıkarılması için kesip-ekleme noktasından bir endonükleaz ile kesildikten sonra, ekzon uçları olgun bir tRNA molekülü oluşturmak üzere birleştirilir.

Ökaryotlarda mRNA'nın işlenmesi

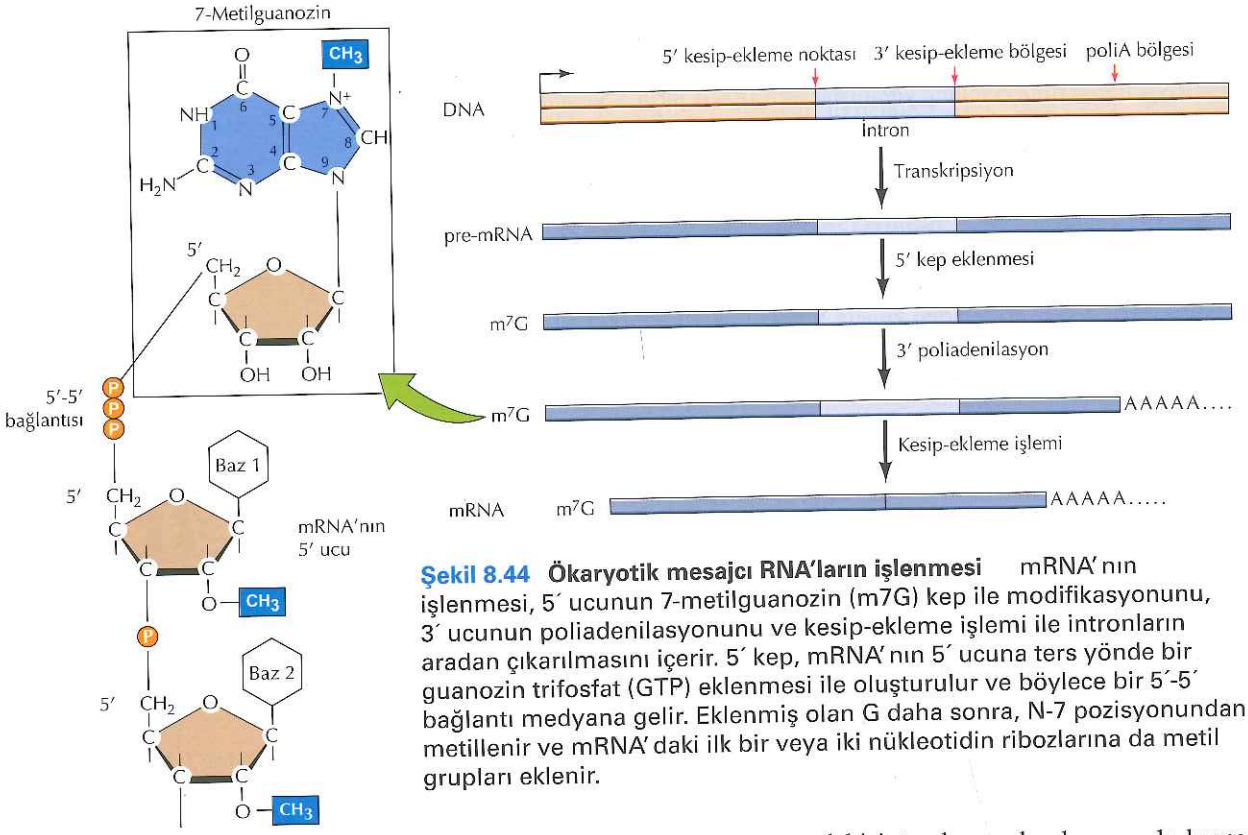
Ribozomal ve taşıyıcı RNA'ların işlenmesinden farklı olarak, mesajcı RNA'ların işlenmesi, bakteriler ve ökaryotik hücreler arasında büyük bir farklılık gösterir. Bakterilerde, ribozomların mRNA'ya doğrudan erişimi vardır ve transkripsiyon sürerken yeni sentezlenen mRNA zinciri üzerinde translasyon başlar. Ökaryotlarda, nükleusta sentezlenen mRNA'nın protein sentezinde kalıp olarak kullanılabilmesi için öncelikle sitoplazmaya taşınması gereklidir. Ayrıca, ökaryotik hücrelerde transkripsiyonun ilk ürünleri (**pre-mRNA'lar**), nükleustan ayrılmadan önce, kapsamlı modifikasyona uğrarlar. mRNA molekülleri, nükleusta işlenmelerinden sitoplazmaya taşınmalarına, translasyona ve en sonunda yıkımlarına kadar geçen sürede hep mesajcı ribonükleoprotein partikülleri (**mRNP'ler**) olarak adlandırılan proteinlerle etkileşim içindedirler. Bu RNA'ya-bağlanan proteinler mRNA işlenmesinden, taşınmasından ve mRNA işlevinin düzenlenmesinden sorumludurlar.

Mesajcı RNA'ların işlenmesi, ilk transkriptin her iki ucunun

Animasyon 8.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a8.2

RNA İşlenmesi Ökaryotik hücreler, transkripsiyonun RNA ürününü olgun ve translasyona hazır bir mesajcı RNA oluşturmak için, işlemden geçirmelidirler.

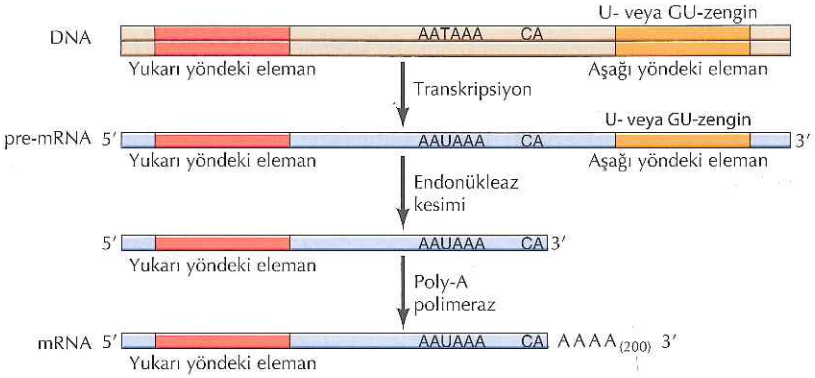


Şekil 8.44 Ökaryotik mesajcı RNA'ların işlenmesi mRNA'nın işlenmesi, 5′ ucunun 7-metilguanozin (m7G) kep ile modifikasyonunu, 3′ ucunun poliadenilasyonunu ve kesip-ekleme işlemi ile intronların aradan çıkarılmasını içerir. 5′ kep, mRNA'nın 5′ ucuna ters yönde bir guanozin trifosfat (GTP) eklenmesi ile oluşturulur ve böylece bir 5′-5′ bağlantı medyana gelir. Eklenmiş olan G daha sonra, N-7 pozisyonundan metillenir ve mRNA'daki ilk bir veya iki nükleotidin ribozlarına da metil grupları eklenir.

modifikasyonunun yanı sıra, ortasındaki intronların çıkarılmasını da kapsar (Şekil 8.44). Bu işlenme reaksiyonları, bir pre-mRNA'nın sentezinin ardından gerçekleşen bağımsız olaylar olmaktan ziyade, transkripsiyonla eşzamanlı olarak gerçekleşirler. Böylece mRNA sentezi ve işlenmesi, gen ekspresyonunun birbiriyle sıkı bir şekilde koordine edilen basamakları haline gelmiş olur. RNA polimeraz II'nin C-ucu bölgesi (CTD), mRNA işlenmesinde görevli enzim kompleksleri için bağlanma bölgesi olarak iş görerek, işlenmenin koordine edilmesinde kilit bir rol oynar. Bu RNA işlenmesi enzimlerinin polimeraz II'nin CTD'siyle etkileşmesi, mRNA işlenmesindeki spesifikliği sağlar. Polimeraz I ve III bir CTD'den yoksundur ve bu sebeple transkriptleri aynı enzim kompleksleri tarafından işlenmez.

Mesajcı RNA işlenmesinde ilk basamak, transkriptin 5′ ucuna **7-metilguanozin kep** adı verilen bir yapının eklenmesiyle gerçekleşen modifikasyondur. Kep eklenmesinden sorumlu enzimler, transkripsiyonun başlamasını takiben, fosforillenmiş CTD'ye getirilirler ve RNA'nın ilk 20-30 nükleotidinin transkripsiyonunun ardından kep eklenir. Kep eklenmesi, RNA'nın 5′ ucu nükleotidine ters yönde, bir guanozin trifosfatın (GTP) eklenmesi ile başlar. Daha sonra, bu G kalıntısına ve RNA zincirdeki bir veya iki 5′ nükleotidin riboz gruplarına metil grupları eklenir. 5′ kep RNA'yı korumanın yanı sıra, translasyon esnasında ökaryotik mRNA'ların ribozoma yerleşmelerini de sağlar (bkz. Bölüm 9).

Ökaryotik mRNA'ların çoğunun 3′ucu, transkripsiyonun sonlanması ile değil, primer transkriptin kesilmesi ve **poliadenilasyon** adı verilen bir işlenme reaksiyonu ile bir **poli-A kuyruğunun** eklenmesiyle tanımlanır (Şekil 8.45). Poliadenilasyon sinyalleri, poliadenilasyon bölgesinin 10 ile 30 nükleotid



Şekil 8.45 Ökaryotik mRNA' ların 3′ uçlarının oluşumu Memeli hücrelerindeki poliadenilasyon sinyalleri, yukarı ve aşağı yöndeki elemanlara (U- veya GU- zengin) ek olarak, altılı bir nükleotid diziden (AAUAAA) oluşur. Bir endonükleaz, pre-mRNA'yı AAUAAA'nın 10 ile 30 nükleotid aşağısından, genellikle bir CA dizisinden keser. Daha sonra poli-A polimeraz, RNA'nın 3′ ucuna yaklaşık 200 adenin (A) içeren bir poli-A kuyruk ekler.

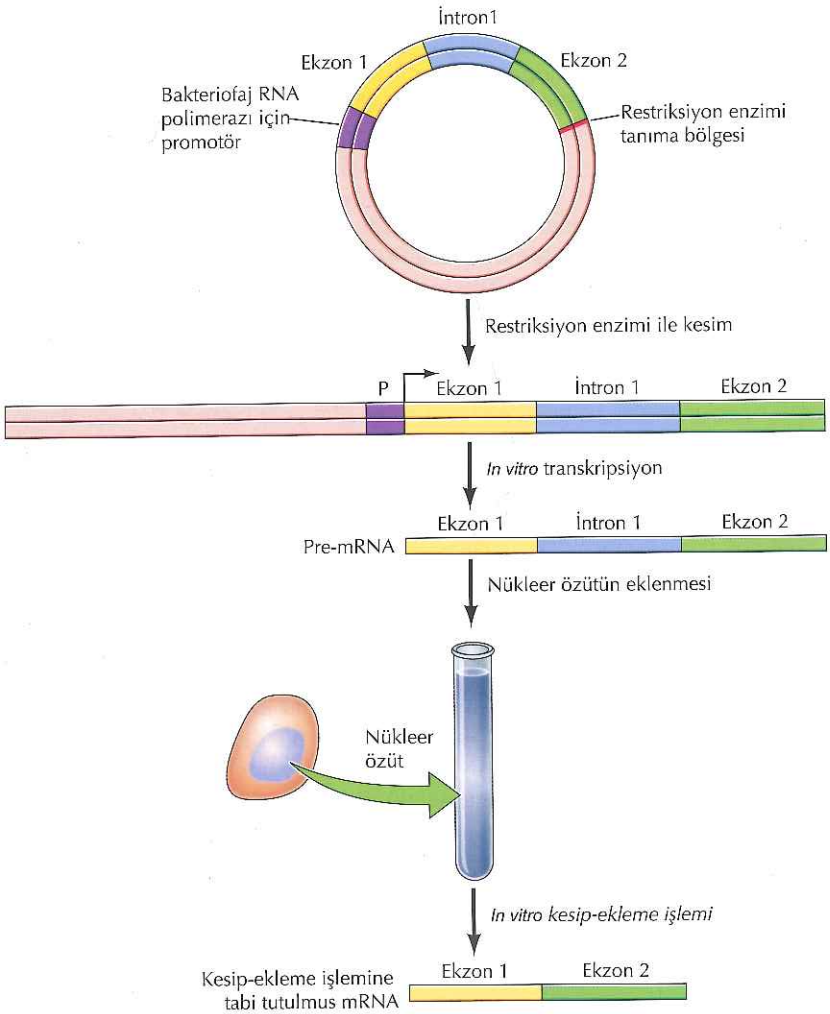
yukarı yönünde bulunan ve yüksek derecede korunmuş altılı bir nükleotid dizi (memelilerde AAUAAA) ile aşağı yönde U- veya GU- zengin bir dizi elemanını içerir. Bu diziler, RNA zincirini kesen bir endonükleazı ve transkripte yaklaşık 200 nükleotidlik bir poli-A kuyruğu ekleyen farklı bir poli-A polimerazı içeren bir protein kompleksi tarafından tanınır. Bu RNA işlenmesi enzimleri, RNA polimeraz II'nin fosforillenmiş CTD'si ile bağlantılıdır ve polimeraz ile birlikte transkripsiyon başlangıç noktasından itibaren tüm yolu kateder. Poliadenilasyon sinyalinin tanınması, mRNA'nın transkripsiyonunun sonlanmasına, kesilmesine ve poliadenilasyonuna yol açar. Bunu takiben, poli-A eklenme bölgesinin aşağısından sentezlenmiş olan RNA yıkıma uğrar.

Ökaryotlardaki mRNA'ların tamamına yakını poliadenillenmiştir ve poli-A kuyruklarının, hem translasyonu hem de mRNA kararlılığını düzenlediği gösterilmiştir. Buna ek olarak, poli-A kuyruk uzunluğundaki değişimlerin mRNA translasyonunu kontrol ettiği gelişimin erken dönemlerinde, poliadenilasyon önemli bir düzenleyici rol oynar. Örneğin, döllenmemiş yumurtalar içinde, kısa poli-A kuyruklu (genellikle 30 ile 50 nükleotid uzunlukta) birçok mRNA proteine çevrilmemiş halde saklanır. Döllenme bu depolanmış mRNA'ların poli-A kuyruklarının uzamasını uyararak, translasyonu ve erken embriyonik gelişim için gerekli olan proteinlerin sentezini aktive eder.

Pre-mRNA'ların en dikkat çekici modifikasyonu, kesip-ekleme işlemi ile intronların çıkartılmasıdır. Daha önceki bölümlerde tartışıldığı gibi, ökaryotik genlerin çoğunun kodlayıcı dizileri, olgun mRNA'dan kusursuz bir şekilde kesilip çıkartılan kodlamayan dizilerle (intronlar) kesintiye uğramıştır. Memelilerdeki genlerin çoğu birçok intron içerir ve bu ekzonlarının oluşturduğundan yaklaşık on kat daha büyük bir pre-mRNA dizisine tekabül eder. İntronların 1977 yılındaki beklenmedik keşfi, işlevsel mRNA ürünlerinin ortaya çıkması için yüksek derecede hassas olması gereken kesip-ekleme mekanizmasını anlamaya yönelik, yoğun bir araştırma gayretine neden olmuştur. Kesip-ekleme işlemi üzerine yapılan daha sonraki çalışmalar, gen düzenlenmesinin yeni mekanizmalarını aydınlatmakla kalmayıp, RNA moleküllerinin yeni katalitik aktivitelerini de ortaya çıkarmış ve alternatif kesip-ekleme işleminin memeli genomlarının repertuarını nasıl genişlettiğini de anlamamıza yol açmıştır.

Kesip-ekleme (splicing) mekanizmaları

Pre-mRNA kesip-ekleme işlemini anlamada anahtar, kesip-ekleme reaksiyonunu etkin bir şekilde gerçekleştirebilen *in vitro* sistemlerin geliştirilmesi oldu (Şekil 8.46). Yapısal genlerin (intronları ile beraber), ve kolayca büyük miktarlarda izole edilebildiler. Bakteriofaj RNA polimerazlarının promotörlerine bitişik olarak klonlanmalarıyla, pre-mRNA'lar *in vitro* olarak sentezlenebildiler. Bu plazmidlerin transkripsiyonu, büyük miktarlarda pre-mRNA hazırlamak için kullanılabildi ve bunların üzerine memeli hücrelerinin nükleer özütleri eklendiğinde, doğru şekilde kesilip-eklendikleri görüldü. Transkripsiyonda olduğu gibi, bu tip *in vitro* sistemlerin kullanımı, kesip-ekleme işleminin canlı hücrelerde olabileceğinden çok daha ayrıntılı bir biçimde analiz edilmesine olanak sağladı.



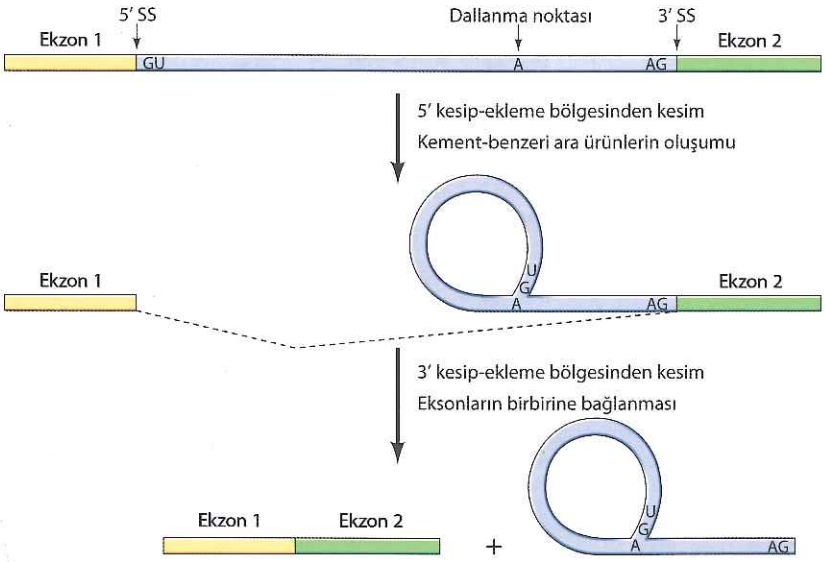
Şekil 8.46 *İn vitro* kesip-ekleme işlemi İntron içeren bir gen, bakteriofaj RNA polimerazı tarafından tanınan bir promotörün (P) aşağı yönüne klonlanır. Plazmid, eklenmiş genin 3′ ucundan kesim yapan bir restriksiyon enzimi ile kesilerek, lineer bir DNA molekülü oluşturulur. Daha sonra bu DNA, bakteriofaj polimerazı ile *in vitro* transkribe edilerek, pre-mRNA üretilir. Bu pre-mRNA'nın memeli hücrelerinin nükleer özütlerine eklenmesiyle kesip-ekleme reaksiyonları *in vitro* olarak çalışılabilir.

In vitro koşullarda oluşturulan reaksiyon ara ürün ve ürünlerinin analizi, pre-mRNA kesip-ekleme işleminin iki basamakta gerçekleştiğini ortaya koydu (Şekil 8.47). İlk olarak, pre-mRNA 5′ kesip-ekleme noktasından kesilir ve intronun 5′ucu, intronun içindeki bir adenin nükleotidine (3′ ucuna yakın) bağlanır. Bu basamakta, intronun 5′ ucu ile adenin nükleotidinin 2′ hidroksil grubu arasında sıradışı bir bağ oluşur. Meydana gelen ara ürün, intronun bir ilmek oluşturduğu, kement benzeri bir yapıdır. Kesip-ekleme işleminde ikinci basamak, 3′ kesip-ekleme noktasından kesim ile eş zamanlı olarak iki ekzonun birbirine bağlanması şeklinde devam eder. Böylece intron, kement benzeri bir yapı olarak kesilip çıkartılır ve daha sonra lineer hale getirilerek canlı hücrelerin nükleusunda yıkıma uğrar.

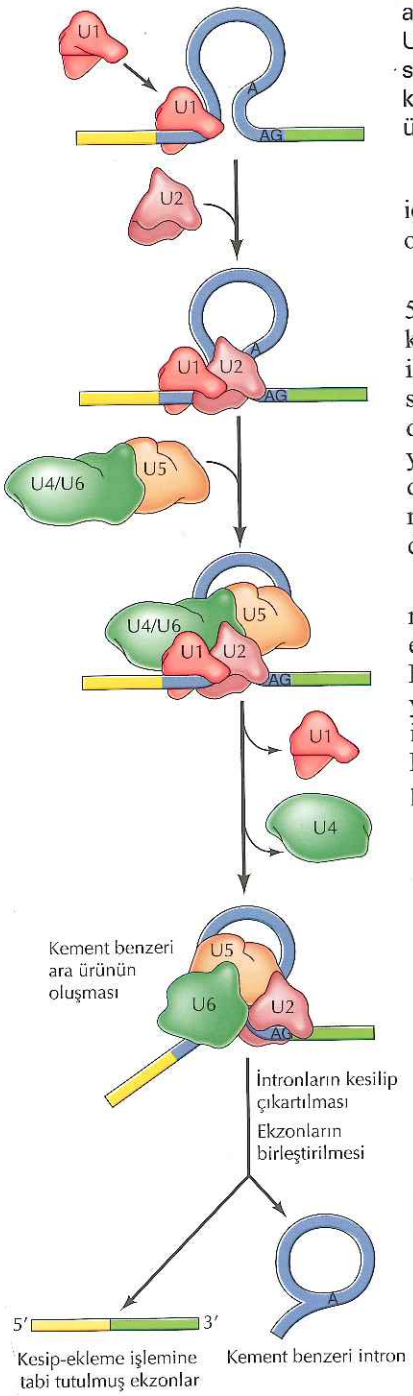
Video 8.3
sites.sinauer.com/cooper7e/v8.3
RNA Kesip-Ekleme İşlemi
Kesip-ekleme işlemi, kodlamayan bölgeleri (intronları) RNA transkriptinden çıkarır, böylece tamamlanmış mRNA'da sadece protein-kodlayan bölgeler bırakılmış olur.

Bu reaksiyonlar, pre-mRNA'ların üç kritik önemdeki dizi elemanını tanımlar: 5′ kesip-ekleme noktası dizileri, 3′ kesip-ekleme noktası dizileri ve intron içinde dallanma noktasındaki diziler (kement benzeri yapıyı oluşturmak üzere intronun 5′ ucunun bağlandığı nokta). Pre- mRNA'lar, bu pozisyonların her birinde, kesip-ekleme kompleksinin pre-mRNA'ları tanımasını ve kesip-ekleme işlemindeki kesme ve ekleme reaksiyonlarını gerçekleştirmesini sağlayan benzer ortak (konsensus) diziler içerir.

Nükleer özütlerin biyokimyasal analizi, kesip-ekleme işleminin **splaysozomunlar** adı verilen, protein ve RNA'lardan oluşmuş büyük kompleksler içinde gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Splaysozomun RNA bileşenleri: U1, U2, U4, U5 ve U6 adı verilen beş tip **küçük nükleer RNA'dır (snRNA'lar).** Yaklaşık olarak 50 ila 200 civarında nükleotidden oluşan snRNA'lar, altı ila on protein molekülü ile kompleks yaparak, kesip-ekleme işleminde merkezi rol oynayan **küçük nükleer ribonükleoprotein partiküllerini (snRNP'ler)** oluştururlar. U1, U2 ve U5 snRNP'lerinin her biri tek bir snRNA molekülü



Şekil 8.47 Pre-mRNA'nın kesip-ekleme işlemi Kesip-ekleme reaksiyonu, iki aşamada gerçekleşir. İlk aşama, 5′ kesip-ekleme noktasında (SN) kesimi ve intronun 5′ ucunun intron içindeki bir A ile birleştirilmesini kapsar (dallanma noktası). Bu reaksiyon, intronun bir ilmek oluşturduğu, kement benzeri bir ara ürün meydana getirir. İkinci basamak, 3′ kesip-ekleme noktasındaki kesim ve eşzamanlı olarak ekzonların birbirine bağlanmasıdır. Bu reaksiyon sonucunda intron, kement benzeri bir yapı halinde kesilip çıkartılmış olur.

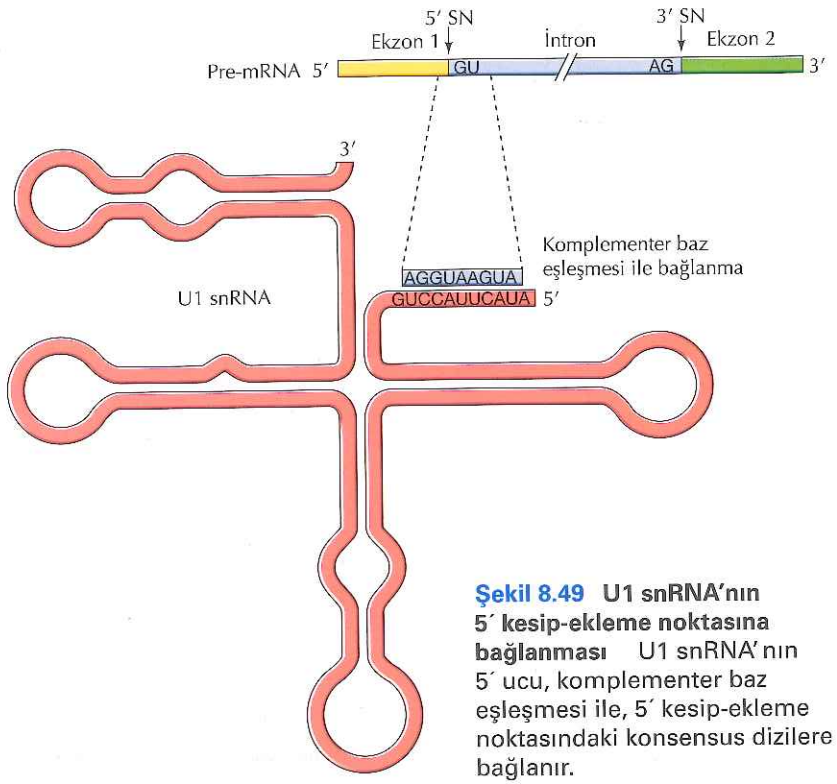


Şekil 8.48 Splaysozom yapılanması Splaysozom yapılanmasındaki ilk aşama, U1 snRNP'in 5′ kesip-ekleme noktasına (SN) bağlanmasıdır. Bunu U2 snRNP'nin dallanma noktasına bağlanması takip eder. U4/U6 ve U5 snRNP'lerini içeren daha önceden oluşmuş bir kompleks splaysozoma katılır. U4 ve U1 splaysozomdan ayrılır ve U6 hem kement benzeri ara ürünün oluşturulmasını, hem de ekzonların birleştirilmesini katalizler.

içerirken, U4 ve U6 snRNA'ları tek bir snRNP içerisinde birbirleriyle kompleks oluşturur.

Splaysozom yapılanmasındaki ilk basamak, U1 snRNP'in, pre-mRNA'nın 5′ kesip-ekleme noktasının bulunduğu bölgeye bağlanmasıdır (Şekil 8.48). 5′ kesip-ekleme noktalarının tanınması, 5′ kesip-ekleme noktası konsensus dizisi ile U1 snRNA'nın 5' ucundaki komplementer dizi arasındaki baz eşleşmesi sayesinde gerçekleşir (Şekil 8.49). Daha sonra U2 snRNP, dallanma noktası dizisi ile U2 snRNA arasında gerçekleşen benzer şekildeki baz eşleşmesi yoluyla, dallanma noktasına bağlanır. U4/U6 ve U5 snRNP'lerini içeren ve daha önceden oluşmuş bir kompleks splaysozomuna katılır. Kesip-ekleme reaksiyonları daha sonra U6 tarafından katalizlenerek, snRNA'ların yeniden düzenlenmeleri eşliğinde devam eder.

snRNA'lar sadece pre-mRNA'ların kesip-ekleme ve dallanma noktalarındaki konsensus dizileri tanımakla kalmaz, aynı zamanda kesip-ekleme reaksiyonunu direkt olarak katalizlerler. Kesip-ekleme işleminde RNA'ların katalitik rolü, bazı RNA'ların **kendi kendilerine kesip-ekleme** yapabilmelerinin; yani diğer protein veya RNA faktörleri olmadan, kendi intronlarının çıkartılmasını katalizleyebilmelerinin keşfi ile gösterilmiştir. Kendi-kendine kesip-ekleme, ilk kez Tom Cech ve arkadaşları tarafından, protozoa *Tetrahymena* 28S rRNA'sının incelenmesi sırasında tanımlanmıştır.



Şekil 8.49 U1 snRNA'nın 5′ kesip-ekleme noktasına bağlanması U1 snRNA'nın 5′ ucu, komplementer baz eşleşmesi ile, 5′ kesip-ekleme noktasındaki konsensus dizilere bağlanır.

Anahtar Deney

snRNP'lerin Keşfi

Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus

Michael R. Lerner & Joan A. Steitz, Yale University, New Haven, CT

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1979, Volume 76: pages 5495-5499

Bağlam

İntronların 1977 yılında keşfi, ökaryotik hücrelerde mRNA üretimi için, tümüyle beklenmedik bir işlenme reaksiyonunun gerektiğine dikkat çekti. İntronlar, pre-mRNA'dan doğru bir şekilde kesilip çıkartılmalı ve bunu, olgun bir mRNA molekülü elde etmek için, ekzonların birleştirilmesi takip etmeliydi. Pre-mRNA kesip-ekleme işleminin beklenmedik doğası dikkate alındığında, kesip-ekleme reaksiyonunun mekanizmasının anlaşılması, birçok moleküler biyolog tarafından ilgi duyulan bir alan haline geldi. Bu mekanizmanın aydınlatılmasındaki en önemli aşamalardan biri, snRNP'lerin keşfi ve pre-mRNA kesip-ekleme işlemindeki görevlerinin belirlenmesi olmuştur.

Küçük nükleer RNA'lar, ilk defa 1960'ların sonunda, ökaryotik hücrelerde tanımlanmıştı. Ancak, snRNA'ların işlevi bilinmezliğini koruyordu. Michael Lerner ve Joan Steitz, 1979'daki bu makallelerinde, snRNA'ların büyük kısmının, snRNP denilen RNA-protein kompleksleri olarak bulunduklarını gösterdiler. Ayrıca, ilk kez bu RNA-protein komplekslerinin pre-mRNA kesip-ekleme işleminde işlev görebileceği fikrini öne sürdüler. snRNP'lerin bu şekilde tanımlanması, pre-mRNA kesip-ekleme işlemindeki rollerini doğrulayan ve bu işlem için kullandıkları mekanizmaları aydınlatan çeşitli deneylere öncülük etti.

Deneyler

snRNP'lerin tanımlanması, hastanın kendi normal hücre bileşenlerine karşı antikor ürettiği otoimmün bir hastalık olan, sistemik lupus eritematozisli hastaların antiserumlarının kullanılmasıyla sağlandı. Sistemik lupus eritematozisli hastaların ürettiği antikorların çoğu, doğrudan DNA, RNA ve histonları da kapsayan nükleer bileşenlere karşıdır. snRNP'lerin keşfi, Lerner ve Steitz'in, sistemik lupus eritematozisli hastaların antikorları tarafından tanınan, ribonükleoprotein (RNP) ve Sm olarak adlandırılan iki antijeni karakterize ettikleri çalışmalar ile gerçekleşti. Dolaylı bulgular, RNP'nin, adının da ima ettiği gibi, hem protein hem RNA'dan oluştuğuna işaret etti, ancak moleküler düzeyde ne RNP ne de Sm karakterize edilebildi.

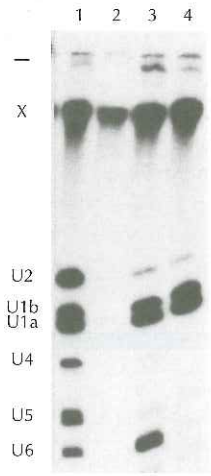
RNP ve Sm antijenlerinin olası RNA bileşenini tanımlamak için, fare hücrelerinin nükleer RNA'ları ^{32}P ile radyoaktif olarak işaretlendi ve farklı sistemik lupus eritematozisli hastaların antiserumları ile immünçöktürüldü (bkz. Şekil 5.11). Farklı hastaların antiserumlarıyla seçici olarak çöktürülen, ancak normal kontrol hastanın serumuyla çöktürülemeyen, altı spesifik snRNA türü bulundu (şekle bakınız). Anti-Sm serumu, bu snRNA'ların U1a, U1b, U2, U4, U5 ve U6 olarak adlandırılan altı tanesini de immünçöktürdü. Anti-RNP serumu yalnızca U1a ve U1b'yi immünçöktürürken, üçüncü bir hastanın serumu (çoğunlukla anti-RNP olarak tanımlandı) U1a, U1b ve U6'yı immünçöktürdü. İmmünçökelen snRNA'lar, daha sonra, dizi analizi ile ayrıntılı şekilde tanımlandı. Bu tanımlama, U1a, U1b ve U2'nin, memeli hücrelerinde daha önce en çok miktarlarda bulunduğu rapor edilmiş snRNA'ler ile aynı olduğunu ve U1a ve U1b'nin, insan hücrelerinde bulunan U1 snRNA'sının tek bir türünün dizi varyantlarını temsil ettiğini gösterdi. Buna karşın; U4, U5 ve U6 snRNA'ları, Lerner ve Steitz'in bu deneyleriyle yeni tanımlanmış oldu.

Önemli olarak, bu snRNA'ların immünçöktürülmesi, onların RNA-protein komplekslerinin bir bileşeni olduklarını gösterdi. snRNA'ların altısını da immün-çökelten anti-Sm serumun, bir protein antijene karşı olduğu, daha önceden gösterilmişti. Benzer şekilde, anti-RNP serumunun antijeni tanınması için de bu proteinin gerekli olduğu biliniyordu. Dahası, Lerner ve Steitz, RNA'ların fenolle ekstraksiyonu sürecinde, proteinler önceden uzaklaştırılmış olsa da, snRNA'ların hiç birinin immün-çökelmediğini gösterdiler. 35S-metiyonin ile radyoaktif olarak işaretlenmiş proteinler içeren hücrelerin ileri analizlerinde, anti-Sm ve anti-RNP serumu tarafından, snRNA'lar ile birlikte immünçökeltilen yedi nükleer protein tanımlandı. Bu bulgular, altı snRNA'nın her birinin, spesifik nükleer proteinler ile birlikte snRNP kompleksleri şeklinde bulunduğunu gösterdi.

Joan Steitz

Etki

snRNA'ların, spesifik antiserumlar tarafından tanınan snRNP'lerin bileşenleri olduğunun anlaşılması,



Sistemik lupus eritematozis hastalarının anti-serumları ile snRNA'ların immünçökeltilmesi 1. Kuyu, anti-Sm; 2. Kuyu, normal kontrol serum; 3. Kuyu, primer olarak RNP antijenini tanıyan antiserum; 4. Kuyu, anti-RNP. X olarak belirtilen spesifik olmayan bir RNA'nın, kontrol de dahil, bütün immünçökeltilerde görüldüğüne dikkat edin.

(sonraki sayfada devam edilmiştir)

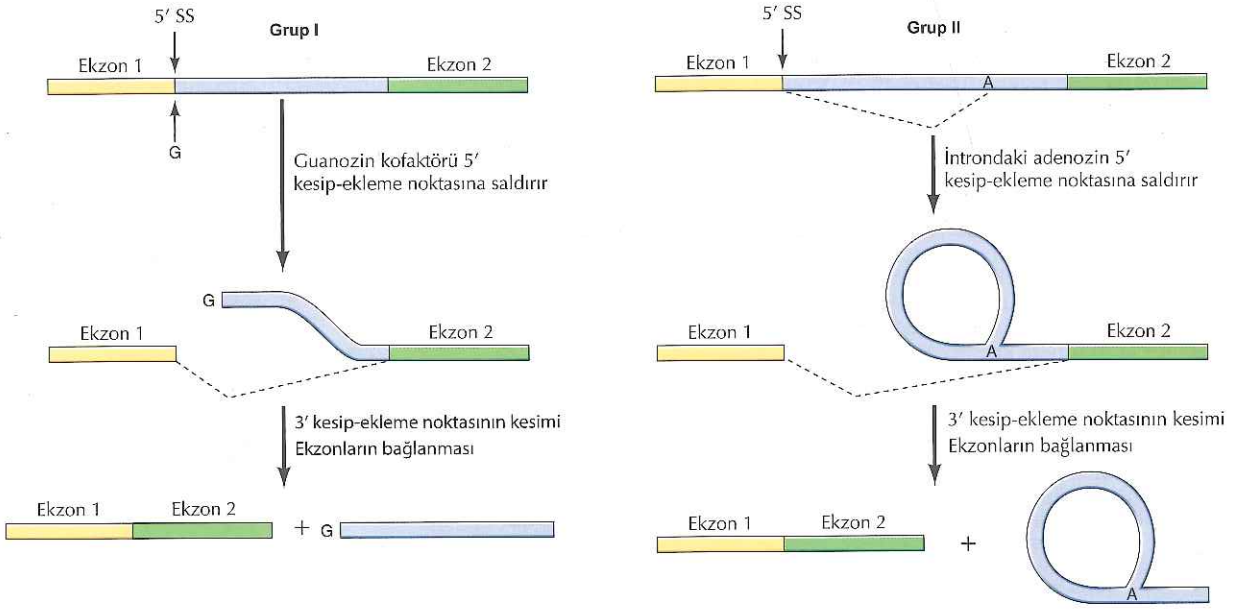
Anahtar Deney

snRNA işlevlerinin araştırılmasına yeni yaklaşımlar kazandırdı. Lerner ve Steitz, snRNA'ların "en ilgi çekici" olası rollerinin, pre-mRNA kesip-ekleme işleminde olabileceğine işaret ettiler ve U1 snRNA'nın 5′ ucuna yakın dizilerinin, kesip-ekleme noktalarına komplementer olduğuna dikkat çektiler.

Steitz ve çalışma arkadaşları, daha sonra, snRNP'lerin kesip-ekleme mekanizmasındaki kritik görevlerini kanıtlayan bir seri deneyle çalışmalarını sürdürdüler. Bu çalışmalar, U1 snRNA'nın korunmuş 5′ dizisinin, 5′ kesip-ekleme noktasındaki konsensus dizilere komplementer olduğunun gösterildiği, daha kapsamlı dizi analizlerini içeriyordu. Bu analizler, U1'in, 5′ kesip-ekleme noktasını tanımada işlev gördüğüne işaret ediyordu. Ayrıca snRNP'lere karşı antiserum kullanılarak, hem izole nükleuslarda hem de *in vitro* kesip-ekleme özütlerinde, U1'in pre-mRNA'nın kesip-eklemei için gerekli olduğu gösterildi. Daha sonra yapılan çalışmalar, snRNA'ların yalnızca kesip-ekleme noktalarının tanınmasında değil, kesip-ekleme reaksiyonunun katalizlenmesinde de kritik rol oynadığını gösterdi. snRNA'ların, spesifik antiserumlar tarafından tanınabilen snRNP'lerin bir bileşeni olduklarının keşfi, böylelikle pre-mRNA kesip-ekleme mekanizmasının anlaşılabilmesinin yolunu açmış oldu.

Bu RNA, pre-rRNA'nın proteinlerin olmadığı bir ortamda inkübasyonunu takiben çıkartılan yaklaşık 400 bazlık bir intron içerir. Daha sonraki çalışmalar, kesip-ekleme işleminin, pre-rRNA molekülünden kendisini çıkartmak için bir ribozim olarak çalışan bir intron tarafından katalizlendiğini ortaya koymuştur. *Tetrahymena* rRNA'sının kendi kendine kesip-ekleme yapabilmesinin keşfi daha önce tartışılmış olan RNaz P çalışmaları ile birlikte RNA'nın katalitik aktivitesinin gösterildiği ilk çalışmalar olmuştur.

Daha sonraki çalışmalar, mitokondri, kloroplast ve bakterilerde kendi kendine kesip-ekleme yapan RNA'ların varlığını ortaya koymuştur. Bu kendi

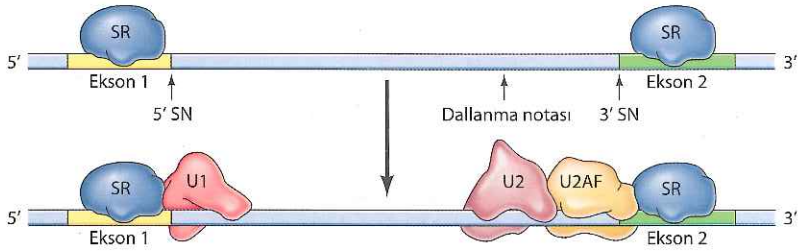


Şekil 8.50 Kendi kendine kesip-ekleme yapan intronlar Kendi kendine kesip-ekleme yapan grup I ve grup II intronlar, reaksiyon mekanizmaları ile birbirlerinden ayırt edilirler. Grup I intronlarda, kesip-ekleme işleminde ilk basamak, 5′ kesip-ekleme noktasının bir guanozin (G) kofaktörle reaksiyonu sonucunda kesilmesidir. Sonuç, intronun 5′ ucuna G eklenmiş lineer bir ara üründür. Grup II intronlarda (pre-mRNA kesip-ekleme işleminde olduğu gibi) ilk basamak, intron içindeki bir adenozin (A) ile reaksiyon sonucu 5′ kesip-ekleme noktasının kesilmesi ve kement benzeri bir ara ürünün oluşumudur. Her iki durumda da ikinci basamak, 3′ kesip-ekleme noktasının kesilmesi ve eşzamanlı olarak ekzonların birbirine eklenmesidir.

kendine kesip-ekleme yapabilen RNA'lar, reaksiyon mekanizmalarına göre iki sınıfa ayrılırlar (Şekil 8.50). Grup I intronlar (örn. *Tetrahymena* pre-rRNA'sı) için kesip-ekleme işleminde ilk basamak, 5′ kesip-ekleme noktasının bir guanozin (G) kofaktör aracılığıyla kesilmesidir. Daha sonra, serbest ekzonun 3′ ucu, intronun lineer bir RNA olarak çıkartılması için, 3′ kesip-ekleme noktası ile reaksiyona girer. Bunun aksine, grup II intronlarının (bakteri, mitokondri ve kloroplastlardaki bazı mRNA, rRNA ve tRNA genlerinin içinde bulunurlar) kendi kendilerine gerçekleştirdikleri kesip-ekleme reaksiyonları, intron içindeki bir adenozin (A) nükleotidinin saldırısı sonucu 5′ kesip-ekleme noktasının kesildiği nükleer pre-mRNA kesip-ekleme mekanizmasına çok benzer. Sonuç, pre-mRNA kesip-ekleme işleminde olduğu gibi, daha sonra kesilip çıkartılan kement benzeri bir ara üründür.

Splaysozom-aracılı pre-mRNA kesip-ekleme işlemi ile grup II intronlarının kendi kendilerine yaptıkları kesip-ekleme işlemi arasındaki benzerlik, splaysozomun aktif katalitik unsurlarının proteinlerden ziyade RNA'lar olduğunu akla getirmiştir. Bu benzerlikler özellikle pre-mRNA kesip-ekleme işleminin, splaysozomdaki snRNA'lar tarafından katalizlendiği fikrini öne sürmüştür. Pre-mRNA kesip-ekleme işlemi üzerine yapılan daha sonraki çalışmalar bu görüşü açık bir biçimde desteklemiştir ve günümüzde artık pre-mRNA kesip-ekleme işleminde her iki basamağın da U6 snRNA tarafından katalizlendiği kesin olarak bilinmektedir. Böylelikle, pre-mRNA kesip-ekleme işlemi, kendi kendine kesip-ekleme yapan grup II intronlara benzer şekilde çalışan U6 snRNA tarafından katalizlenen RNA-temelli bir reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Hücre içinde, snRNP'lerin protein bileşenleri yine de gereklidir ve bu bileşenler, hem splaysozomunun yapılanmasına hem de kesip-ekleme reaksiyonlarına katılırlar.

snRNP bileşeni olmayan birtakım protein kesip-ekleme faktörleri de, özellikle pre-mRNA'lardaki doğru kesip-ekleme noktalarının tanınmasında olmak üzere, splaysozomun yapılanmasında kritik rol oynarlar. Memeli pre-mRNA'ları, büyük intronlarla (ortalama 3500 nükleotid) birbirinden ayrılmış çok sayıda kısa ekzonlar (insanlarda ortalama 150 nükleotid) içerir. İntronlar içinde kesip-ekleme noktalarına benzeyen birçok dizi sıkça bulunur, bu yüzden kesip-ekleme düzeneği, işlevsel bir mRNA oluşturabilmek için, intron/ekzon sınırlarındaki uygun 5′ ve 3′ kesip-ekleme noktalarını tanımlayabilmelidir. Kesip-ekleme faktörleri, spesifik RNA dizilerine bağlanarak splaysozomunların doğru kesip-ekleme noktalarına yönlenmelerini ve sonrasında protein-protein etkileşimleri ile, U1 ve U2 snRNP'lerin pre-mRNA üzerinde uygun bölgelere yerleşmelerini sağlar. Örneğin, SR kesip-ekleme faktörleri ekzonlar içindeki spesifik dizilere bağlanır ve U1 snRNP'nin 5′ kesip-ekleme noktasına getirilmesi işlevini görür (Şekil 8.51). SR proteinleri aynı zamanda, 3′ kesip-ekleme noktalarında



Şekil 8.51 Kesip-ekleme faktörlerinin splaysozomun yapılanmasındaki rolü SR kesip-ekleme faktörleri ekzonlar içindeki spesifik dizilere bağlanır. SR proteinleri, U1 snRNP'yi 5′ kesip-ekleme noktasına ve ilave bir kesip-ekleme faktörünü (U2AF) 3′ kesip-ekleme noktasına getirirler. U2AF daha sonra U2 snRNP'yi dallanma noktasına getirir.

Bilgi İçin

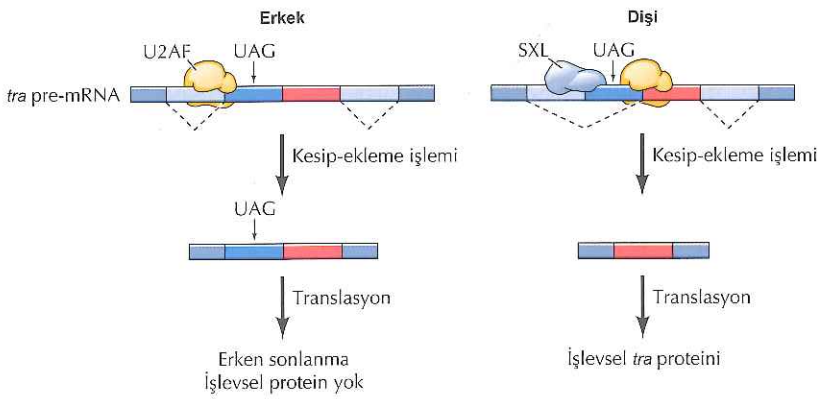
Hatalı kesip-ekleme işleminin, tüm kalıtsal hastalıkların %15'i kadarına neden olduğu tahmin edilmektedir. β-talasemi ve kanserin birkaç tipi bu hastalıklar arasında yer almaktadır (bkz. Bölüm 19).

primidince zengin dizilere bağlanan başka bir kesip-ekleme faktörü (U2AF) ile etkileşir ve bu faktör U2 snRNP'nin dallanma noktasına getirilmesini sağlar. Splaysozom bileşenlerini pre-mRNA'ya taşımalarına ek olarak, kesip-ekleme faktörleri aynı zamanda RNA polimeraz II'nin fosforillenmiş CTD'sine bağlanarak kesip-ekleme işlemi ile transkripsiyonun birbiriyle eşzamanlı olarak gerçekleşmesini de sağlarlar. Kesip-ekleme düzeneğinin RNA polimeraza sıkıca kenetlenmesinin, pre-mRNA sentezlenirken ekzonların doğru bir sırada birleştirilmelerinin sağlanması açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

Alternatif kesip-ekleme işlemi

Pre-mRNA işlenmesinde kesip-ekleme işleminin merkezi bir rol oynaması, gen ekspresyonu düzenlenmesinin, kesip-ekleme düzeneğinin kontrolünde olma olasılığını gündeme getirmiştir. Çoğu pre-mRNA birçok intron içerdiğinden, aynı genin 5′ ve 3′ kesip-ekleme noktalarının farklı kombinasyonları ile farklı mRNA'lar üretilebilir. Ekzonları çeşitli kombinasyonlarda birleştirme olasılığı, aynı pre-mRNA'dan çok sayıda mRNA (ve dolayısıyla çok sayıda protein) meydana getirerek, gen ekspresyonunun kontrolünde yeni bir araç sağlar. **Alternatif kesip-ekleme** adı verilen bu işlem, kompleks ökaryotların genlerinde sıkça görülür. Örneğin, insandaki genlerin neredeyse tamamının, alternatif kesip-ekleme işleminden geçirilen çok sayıda transkript ürettiği tahmin edilmektedir ki bu bazı genler için birkaç bin mRNA'dır. Her insan geni ortalama altı alternatif kesip-ekleme işlemine uğramış mRNA oluşturur ve bunlardan dördü farklı protein kodlar. Dolayısıyla alternatif kesip-ekleme işlemi, memeli genomlarında yaklaşık 21.000 gen ile kodlanabilen proteinlerin çeşitliliğinde kayda değer bir artış sağlar. Alternatif kesip-ekleme paternleri, farklı dokularda ve farklı hücre dışı sinyallere cevaben farklılık gösterdiğinden, gen ekspresyonunun doku-spesifik ve gelişimsel düzenlenmesi için önemli bir mekanizma sağlar.

Doku-spesifik alternatif kesip-ekleme üzerinde iyi çalışılmış örneklerden



Şekil 8.52 ***Drosophila*** **cinsiyetinin belirlenmesinde alternatif kesip-ekleme** *Transformer (tra)* pre-mRNA'sının alternatif kesip-ekleme işlemi, sadece dişi sineklerde eksprese edilen SXL proteini tarafından düzenlenir. Erkeklerde, *tra* pre-mRNA'nın birinci ekzonu bir 3′ kesip-ekleme noktasına bağlanarak, translasyon sonlandırıcı bir kodon (UAG) içeren ikinci bir ekzon oluşturur ve böylece hiç *tra* proteini sentezlenmez. Dişilerde, SXL proteininin bağlanması U2AF'nin bu 3′ kesip-ekleme noktasına bağlanmasını engelleyerek, ekzon 2 içinde daha aşağıdaki alternatif bir bölgenin kullanılmasına yol açar. Bu alternatif 3′ kesip-ekleme noktası, translasyon sonlandırıcı kodonun aşağı yönündedir. Böylece dişilerde eksprese edilen mRNA, işlevsel *tra* proteinin sentezlenmesini sağlar.

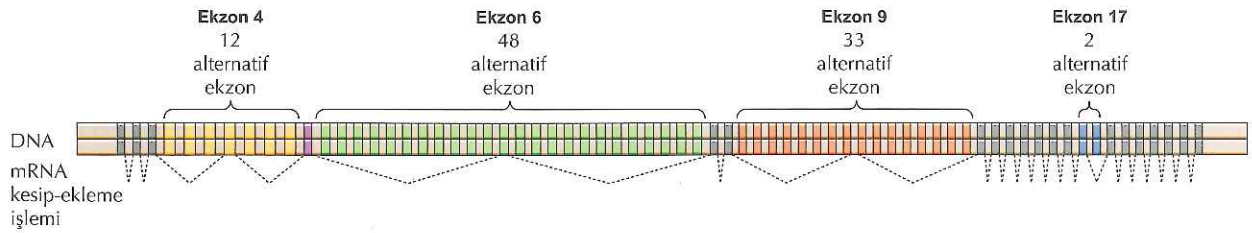
biri, aynı pre-mRNA'nın alternatif kesip-ekleme işleminin sineğin erkek veya dişi olmasını belirlediği, *Drosophila*'da cinsiyet belirlenmesidir (**Şekil 8.52**). *Transformer (tra)* adı verilen bir genin pre-mRNA'sının alternatif kesip-ekleme işlemi, sadece dişi sineklerde eksprese edilen bir protein (SXL) ile kontrol edilir. *Transformer* pre-mRNA üç ekzona sahiptir, fakat iki farklı cinste alternatif 3′ kesip-ekleme noktalarının kullanılması sonucunda, mRNA'ya farklı bir ikinci ekzon katılır. Erkeklerde ekzon 1, bu 3′ kesip-ekleme noktalarından, U2AF kesip-ekleme faktörünün bağlanmasıyla seçilen, en yukarıda olanına eklenir. Dişilerde ise, SXL proteini bu 3′ kesip-ekleme noktasına bağlanır ve U2AF'nin buraya bağlanmasını engeller. Sonuç olarak, dişilerde bu yukarıdaki 3′ kesip-ekleme noktası atlanır ve ekzon 1 bunun yerine, daha aşağıdaki alternatif bir 3′ kesip-ekleme noktasına bağlanır. Erkek *transformer* mRNA'sında bulunan ekzon 2 dizileri, translasyon sonlandırıcı kodon (UAG) içerirler ve bu nedenle erkeklerde hiç protein üretilmez. Bu sonlandırıcı kodon dişi mRNA'sında bulunmadığından, dişi sinekler cinsiyet belirlenmesinde anahtar düzenleyici olarak işlev gören fonksiyonel *transformer* proteinini eksprese ederler.

Bilgi İçin

Memelilerde kulak, farklı frekanslardaki seslere tepki vermek için uyumlanan tüy hücreler içerir. Bu tüy hücrelerin uyumlanmasının kısmen, kanal proteini kodlayan bir genin alternatif kesip-ekleme işlemi aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir.

Transformer'ın alternatif kesip-ekleme işlemi, bir kesip-ekleme faktörünün (U2AF) bağlanmasını engelleyerek fonksiyon gösteren bir represörün (SXL proteini) çalışma şekli için örnek teşkil eder. Pek çok protein pre-mRNA'lardaki susturucu dizilere bağlanarak, alternatif kesip-ekleme işlemini benzer şekillerde düzenler. Diğer durumlarda alternatif kesip-ekleme, aksi takdirde tanınmayacak olan kesip-ekleme noktalarına, kesip-ekleme faktörlerinin getirilmesini sağlayan aktivatörler tarafından kontrol edilir. En çok çalışılmış kesip-ekleme aktivatörleri, spesifik kesip-ekleme güçlendirici dizilerine bağlanan SR protein ailesi üyeleridir (bkz. Şekil 8.51).

Dolayısıyla, alternatif kesip-ekleme işlemi birden çok farklı mekanizma ile düzenlenebilir ve alternatif kesip-ekleme işlemindeki değişkenlik, gelişim ve farklılaşma sırasında eksprese edilen proteinlerin çeşitliliğine önemli bir katkı sağlar. Alternatif kesip-ekleme işlemine en çarpıcı örneklerden biri, nöronlar arası bağlantıların kurulmasında görevli bir *Drosophila* hücre yüzeyi proteinin (*Dscam* olarak adlandırılır) alternatif kesip-ekleme işlemidir. *Dscam* geni, her setten tek bir ekzonun kesip-ekleme işlemi geçiren mRNA'ya eklendiği dört set alternatif ekzon içerir (**Şekil 8.53**). Bu ekzonlar herhangi bir kombinasyonda bir araya getirilebilirler, bu nedenle alternatif kesip-ekleme işleminin bu tek genden 38.016 farklı mRNA ve protein üretebilme potansiyeli vardır. Bu *Drosophila* genomundaki toplam gen sayısının iki katından fazlasına karşılık gelir. Dscam'ın alternatif kesip-ekleme işlemine uğramış formları, nöronlara bireysel bir kimlik kodu sağlar ve bu sinek beyninin gelişimi için ihtiyaç duyulan nöronlar arası bağlantıların kurulmasında çok önemlidir.



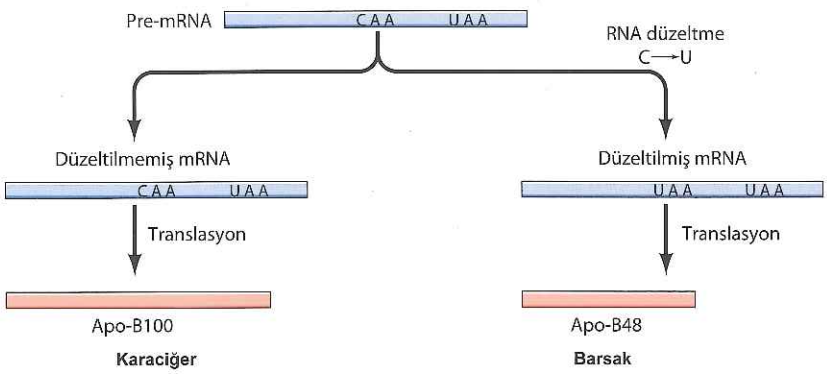
Şekil 8.53 ***Dscam'ın* alternatif kesip-ekleme işlemi** *Dscam* geni (*Drosophila* hücre yüzeyi proteini olan Dscam'i kodlar) dört set alternatif ekzon içerir: ekzon 4 için 12, ekzon 6 için 48, ekzon 9 için 33, ekzon 17 için 2 tane. Bu setlerin her birinden herhangi bir ekzon olgun mRNA'ya dahil edilebilir ve böylece alternatif kesip-ekleme işlemi toplamda 38.016 farklı mRNA üretebilir (12 x 48 x 33 x 2 = 38.016). Mümkün olan alternatif kesip-ekleme işlemlerinden birinin şablonu kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

RNA düzeltme (editing)

RNA düzeltme, bazı mRNA'ların protein-kodlayan dizilerini değiştiren RNA işlenmesi olaylarını (kesip-ekleme işlemi dışındaki) ifade eder. RNA işlenmesinin bu beklenmedik biçimi, ilk kez tripanozomların mitokondri mRNA'larında keşfedilmiştir. Bu organizmada pre-mRNA boyunca birçok noktada U kalıntıları eklenerek ve çıkartılarak mRNA oluşumu sağlanır. Son yıllarda RNA düzeltme, diğer organizmaların mitokondri mRNA'larında, gelişmiş bitkilerin kloroplast mRNA'larında ve bazı memeli genlerinin nükleer mRNA'larında da tanımlanmıştır.

Gelişmiş bitkilerin mitokondri ve kloroplast RNA'larında olduğu gibi, memeli nükleer mRNA'larındaki düzeltme, tRNA işlenmesindekine benzer şekilde, baz modifikasyonu reaksiyonları sonucunda gerçekleşen tek baz değişimlerini içerir. Memeli hücrelerinde, RNA düzeltme reaksiyonları, sitozinin üridine ve adenozinin inozine deaminasyonunu kapsar. Üzerinde en iyi çalışılmış örneklerden biri, kanda lipidleri taşıyan apolipoprotein B mRNA'sının düzeltilme işlemidir. Bu örnekte doku-spesifik RNA düzeltme, apolipoprotein B'nin iki farklı formda oluşmasına sebep olur (**Şekil 8.54**). İnsanlarda Apo-B100 (4536 amino asit), düzeltilmemiş mRNA'nın translasyonu ile karaciğerde sentezlenir. Ancak, daha kısa bir protein olan Apo-B48 (2152 amino asit), deaminasyon ile bir C'nin U'ya değiştiği düzeltilmiş mRNA'nın translasyonu sonucu barsaklarda sentezlenir. Bu değişiklik, düzeltilmemiş mRNA'daki glutamin kodonunu (CAA), düzeltilmiş mRNA'da translasyon sonlandırıcı bir kodona (UAA) dönüştürerek, daha kısa bir Apo-B proteininin sentezlenmesine neden olur. Böylece, Apo-B mRNA'sının doku-spesifik düzeltilme işlemi, karaciğerde ve barsakta yapısal ve işlevsel olarak farklı proteinlerin ekspresyonu ile sonuçlanır. Karaciğerde üretilen tam uzunluktaki Apo-B100 dolaşımda lipidleri taşırken, Apo-B48 diyetle alınan lipidlerin barsaklardan emiliminde görevlidir.

Adenozinin inozine deaminasyonu şeklindeki RNA düzeltme işlemi, memelilerdeki nükleer RNA düzeltme işleminin en sık rastlanılan tipidir. A'nın I'ya düzeltildiği bu tip düzeltme, nöronların yüzeyindeki iyon kanalları ve reseptörlerde tekli amino asit değişikliklerine yol açarak sinir sisteminde önemli bir rol oynar. Örneğin, nörotransmiter serotonin reseptörlerini kodlayan mRNA'ların



Şekil 8.54 Apolipoprotein B mRNA'sının düzeltilme işlemi İnsan karaciğerinde düzeltilmemiş mRNA, Apo-B100 adı verilen 4536 amino asitlik bir protein oluşturmak üzere translasyona uğrar. Fakat insan barsağında mRNA, spesifik bir C'yi U'ya değiştiren bir baz modifikasyonu ile düzeltilir. Bu modifikasyon glutamin için olan kodonu (CAA), sonlandırıcı bir kodona (UAA) dönüştürerek daha kısa bir proteinin (sadece 2152 amino asitten oluşan Apo-B48) sentezlenmesine yol açar.

düzeltilmesi beş farklı noktaya kadar yapılabilir ve bu sayede reseptörün farklı sinyal iletim aktivitelerine sahip 24 değişik versiyonu oluşturulabilir. A'nın I'ya düzeltilmesinin sinir sistemi için önemi, düzeltme enziminden yoksun mutant *C. elegans*, *Drosophila* ve farelerde çeşitli nörolojik bozukluklar geliştiğinin gösterilmesi ile daha ayrıntılı olarak ortaya konmuştur. Son yıllarda yapılan genom-boyu dizileme araştırmaları, RNA düzeltmenin memeli mRNA'larındaki kodlayan dizilerden ziyade intronlardaki kodlamayan dizileri veya translasyona uğramayan bölgeleri etkileyerek, sanılandan çok daha sık gerçekleşiyor olabileceğine işaret etmektedir.

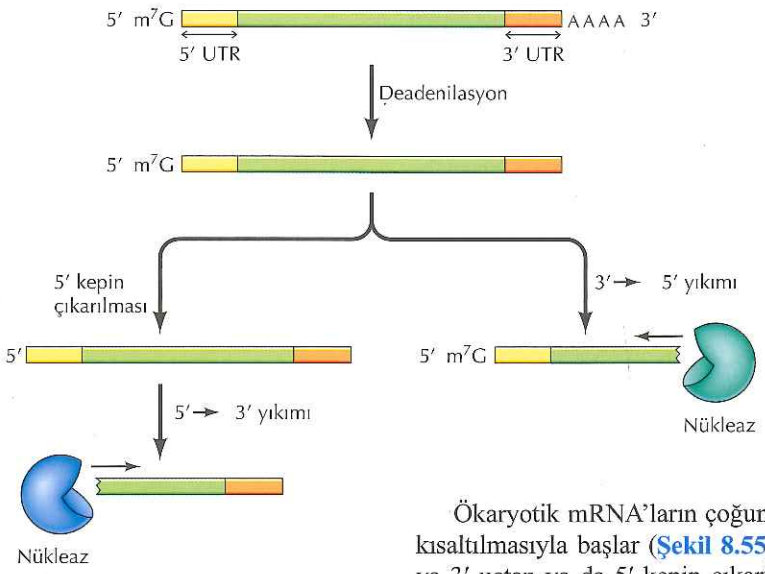
RNA yıkımı

Önceki bölümde tartışılan işlenme basamakları, olgun mRNA'ların oluşumu ile sonuçlanır ve bunlar daha sonra sitoplazmaya taşınarak protein sentezini yönlendirmede işlev görürler. Ancak, pre-mRNA'ya transkribe olan dizilerin büyük bir kısmı yine de nükleus içerisinde yıkıma uğrarlar. Pre-mRNA dizilerinin %90'ından fazlası, kesip-ekleme işlemi ile kesilip çıkarıldıktan sonra nükleus içinde yıkılan intronlardır. Yıkım işlemi, dallanma noktasında oluşan ve nadir görülen 2′-5′ bağını tanıyan bir enzimle, ya da RNA moleküllerinin 5′ veya 3′ uçlarını tanıyan enzimlerin her iki yönde de RNA yıkımını katalizlemeleri ile gerçekleşir. İşlenmiş mRNA'ların 5′ ve 3′ uçları, bu yıkım düzeneğinden sırasıyla, kep eklenmesi ve poliadenilasyon ile korunurlarken, intronların korunmayan uçları tanınır ve yıkıma uğratılır.

Hücreler, intronların yıkımının yanı sıra, transkripsiyon esnasındaki yanlışlar sonucunda oluşan hatalı mRNA'ları saptayan ve yıkıma uğratan kalite kontrol sistemlerine sahiptirler. Bu kalite kontrol mekanizmalarından üzerinde en iyi çalışılmış olanı, tam bir açık okuma çerçevesine sahip olmayan mRNA'ların yıkıldığı **anlamsız-aracılı mRNA yıkımı**dır. Bu mekanizma, hatalı mRNA moleküllerinin ortadan kaldırılmasını sağlar ve bir uçları kesik anormal proteinlerin sentezini engeller. Anlamsız-aracılı mRNA yıkımı, ribozomlar kesip-eklenmiş olan mRNA'lardaki bir ekzon-ekzon bağlantısının yaklaşık 50 nükleotid daha yukarısında yer alan sonlandırıcı kodonlar olarak bilinen erken sonlandırıcı kodonlarla karşılaştıklarında uyarılır. Böyle erken sonlandırıcı kodonların varlığı, translasyonu durdurarak hatalı mRNA'nın yıkılmasına yol açar.

RNA işlenmesindeki en son aşama, RNA molekülünün sitoplazmada yıkılması olarak nitelendirilebilir. Herhangi bir RNA'nın hücre içi düzeyi, onun sentezi ve yıkımı arasındaki denge ile belirlendiği için, RNA'ların hangi hızla yıkıldıkları gen ekspresyonunun kontrolünün diğer bir basamağıdır. Ribozomal ve taşıyıcı RNA'lar kararlı moleküllerdir ve bu kararlılık, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bu RNA'ların yüksek düzeyde bulunmalarının (tüm RNA'ların %90'ından fazlası) nedenidir. Bunun aksine, bakteriyel mRNA'lar hızla yıkılır ve yarı ömürleri genellikle sadece 2-3 dakika kadardır. Bakteriyel mRNA'ların bu hızlı yıkımları hücrelere, büyüme için gerekli besinlerin bulunabilirliğindeki değişimler gibi çevresel koşullarda gerçekleşen değişikliklere hızla cevap verebilme imkanı sağlar.

Ökaryotik hücrelerde farklı mRNA'lar farklı hızlarla yıkılır ve bu durum ökaryotik gen ekspresyonunun düzenlenmesi için ekstra bir değişken sağlar. Memeli hücrelerindeki mRNA'ların yarı ömürleri, 30 dakikadan az bir süreden yaklaşık 20 saate kadar geniş bir çeşitlilik gösterir. Kararlı olmayan mRNA'lar genellikle, çevresel uyaranlara karşı yanıt olarak hücredeki düzeyleri hızla değişen, transkripsiyon faktörleri gibi regülatör proteinleri kodlarlar. Bunun aksine, yapısal proteinleri veya önemli metabolik enzimleri kodlayan mRNA'lar genellikle uzun yarı ömürlüdürler.



Şekil 8.55 mRNA yıkımı mRNA'ların yıkımı genellikle poli-A kuyruklarının kısaltılması (deadenilasyon) ile başlar. Bunu, ya 5′ kepin çıkartılması ve 5′ uçtan yıkım (5′-3′ yıkımı) ya da 3′ uçtan yıkım (3′-5′ yıkımı) izler.

Ökaryotik mRNA'ların çoğunun sitoplazmada yıkımı, poli-A kuyruklarının kısaltılmasıyla başlar (**Şekil 8.55**). Adeninlerini yitiren mRNA'lar daha sonra, ya 3′ uçtan ya da 5′ kepin çıkartılmasıyla 5′ uçtan harekete geçen nükleazlar tarafından yıkılır. Hızlıca yıkılan mRNA'lar çoğu zaman 3′ uçlarına yakın spesifik AU-zengin diziler içerir. Bu diziler, mRNA'ları stabilize eden ya da onları yıkım için yönlendiren proteinler için bağlanma bölgeleri olarak iş görürler. Bu RNA'ya-bağlanan proteinlerin aktiviteleri, büyüme faktörleri ve hormonlar gibi hücre dışı sinyaller tarafından düzenlenir ki, bu sayede hücreler çevresel koşullara cevaben spesifik mRNA'ların yıkım hızlarını kontrol edebilirler. Ayrıca pek çok mRNA'nın yıkımı, mRNA yıkımını uyaran ya da translasyonu inhibe eden miRNA'lar tarafından düzenlenir (Bölüm 9'da ele alınacak). Dolayısıyla, transkripsiyon gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki ilk aşama olsa da, mRNA yıkım hızındaki farklılıklar da hücre içindeki mRNA'ların düzeylerinin kontrol edilmesinde önemli bir rol oynar.

ÖZET

Bakterilerde Transkripsiyon

- ***RNA polimeraz ve transkripsiyon:*** *E. coli* RNA polimerazı α, β, β', ω ve σ alt birimlerinden oluşur. Transkripsiyon, σ'nın promotör dizilere bağlanması ile başlatılır. RNA'nın yaklaşık ilk on nükleotidi sentezlendikten sonra, kor polimeraz σ'dan ayrılır ve kalıp DNA üzerinde hareket ederek RNA zincirini uzatır. Polimeraz, bir sonlandırma sinyaline rastlayıncaya kadar transkripsiyon devam eder. Bkz. **Animasyon 8.1** ve **Video 8.1.**
- ***Represörler ve transkripsiyonun negatif kontrolü:*** Bakterilerde gen düzenlenmesinin örnek modeli, bir represörün promotörle çakışan spesifik DNA dizilerine bağlanmasıyla düzenlenen lac operonudur.
- ***Transkripsiyonun pozitif kontrolü:*** Bazı bakteriyel genler, represörlerden ziyade transkripsiyon aktivatörleri tarafından düzenlenirler.

Ökaryotik RNA Polimerazlar ve Genel Transkripsiyon Faktörleri

- ***Ökaryotik RNA polimerazlar:*** Ökaryotik hücreler; mRNA'ları, miRNA'ları ve lncRNA'ları (polimeraz II), rRNA'ları (polimeraz I ve III) ve tRNA'ları (polimeraz III) kodlayan genleri transkribe eden üç farklı nükleer RNA polimeraz içerirler.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

RNA polimeraz, promotör

operon, operatör, represör, *cis*-etkili kontrol elemanı

ÖZET

- ***Genel transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz II ile transkripsiyonun başlatılması:*** Ökaryotik RNA polimerazlar promotör dizilere doğrudan bağlanmazlar. Transkripsiyonu başlatmak için ek proteinlere (genel transkripsiyon faktörleri) ihtiyaç duyarlar. RNA polimeraz II tarafından transkribe edilen genlerin promotör dizileri, RNA polimerazı ve ilave transkripsiyon faktörlerini promotöre getiren genel transkripsiyon faktörü olan TFIID tarafından tanınır.
- ***RNA polimeraz I ve III ile transkripsiyon:*** RNA polimeraz I ve III her ikisi de rRNA, tRNA ve bazı snRNA genlerinin promotörlerine bağlanmak için, ek transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duyarlar.

Ökaryotlarda Transkripsiyonun Düzenlenmesi

- ***cis-etkili regülatör diziler: promotörler ve güçlendiriciler:*** Ökaryotik genlerin transkripsiyonu, transkripsiyon başlangıç noktasının yüzlerce kilobaz uzağında bulunabilen regülatör dizilere bağlanan proteinler tarafından kontrol edilir. Güçlendiriciler genellikle, gen ekspresyonunu düzenlemek için birlikte çalışan birçok protein için bağlanma bölgeleri içerirler.
- ***Transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri:*** Ökaryotik transkripsiyon faktörleri, promotör veya güçlendiricilerde yer alan, genellikle 6-10 baz çifti uzunluktaki, kısa DNA dizilerine bağlanırlar.
- ***Transkripsiyon düzenleyici proteinler:*** Birçok ökaryotik transkripsiyon faktörü, spesifik DNA dizilerine bağlanmaları temel alınarak izole edilmişlerdir.
- ***Transkripsiyon aktivatörlerin yapısı ve fonksiyonu:*** Transkripsiyon aktivatörleri, birbirinden bağımsız DNA'ya-bağlanma ve aktivasyon bölgelerinden oluşan modüler proteinlerdir. DNA'ya-bağlanma bölgeleri, spesifik regülatör dizilerle olan bağlantıyı sağlarken; aktivasyon bölgeleri, kromatin yapısını değiştiren koaktivatörlerle, genel transkripsiyon faktörleriyle ve Mediyatör proteinlerle etkileşerek transkripsiyonu uyarırlar.
- ***Ökaryotik represörler:*** Ökaryotik hücrelerdeki gen ekspresyonu, aktivatörlerle olduğu kadar, represörlerle de düzenlenir. Bazı represörler, aktivatörlerin veya genel transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını engellerler. Diğer represörler; genel transkripsiyon faktörleriyle, Mediyatör proteinlerle, transkripsiyon aktivatörleriyle veya kromatin yapısını etkileyen korepresörlerle etkileşerek transkripsiyonu inhibe eden, ayrı bir baskılayıcı bölge içerirler.
- ***Uzamanın düzenlenmesi:*** Transkripsiyon, başlama aşamasında olduğu kadar uzama aşamasında da düzenlenir. Pek çok genin, transkripsiyonu başlatmış ancak daha sonra promotörün hemen aşağısında duraksamış beklemekte olan polimeraz II molekülleri vardır. Duraksayan bu polimerazlar, uygun hücre dışı sinyallere cevaben, transkripsiyonu kaldığı yerden devam ettirmeye hazır durumdadırlar.

Kromatin ve Epigenetik

- ***Histon modifikasyonları:*** Histonların modifikasyonu transkripsiyonel düzenlenmeyle çok yakından ilişkilidir. Histon asetilasyonunu katalizleyen enzimler transkripsiyon aktivatörleriyle bağlantıdayken, histon deasetilazlar represörlerle bağlantıdadır. Histonlar aynı zamanda fosforilasyon ve metilasyonla da değişime uğrarlar. Histonların spesifik modifikasyonları gen ekspresyonunu, diğer regülatör proteinler için bağlanma bölgelerinin oluşmasını sağlayarak etkiler. Histon modifikasyonunun belirli paternleri, promotör ve güçlendiricileri işaretler. Bkz. **Video 8.2**.
- ***Kromatin yeniden yapılandırma faktörleri:*** Kromatin yeniden yapılandırma faktörleri, nükleozomların yapısını veya dizilimi değiştirerek transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını kolaylaştırırlar.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

transkripsiyon faktörü, genel transkripsiyon faktörü, TATA kutusu, TATA'ya-bağlanan protein (TBP), TBP-bağlantılı faktör (TAF), Mediyatör

güçlendirici, yalıtkan, topolojik bağlantılı bölge (TAD), CTCF

elektroforetik harekette değişim analizi, kromatin immünçökeltme

DNA-afinite kromatografisi

transkripsiyon aktivatörü, çinko parmak bölgesi, steroid hormon reseptörü, sarmal-kıvrım-sarmal, homeodomein, lösin fermuarı, sarmal-ilmek-sarmal, koaktivatör

korepresör

histon asetilasyonu, DNaz'a aşırı duyarlı bölge

kromatin yeniden yapılandırma faktörü

ÖZET

- ***Histonlar ve epigenetik kalıtım:*** Histon modifikasyonu epigenetik kalıtımın temel mekanizmasıdır.
- ***DNA metilasyonu:*** Sitozin kalıntılarının metilasyonu, ökaryotik genlerin transkripsiyonunu inhibe edebilir ve transpozon elemanların susturulmasında önemlidir. Gen ekspresyonunun metilasyonla düzenlenmesi ayrıca, memeli gelişiminde görevli bazı genlerin transkripsiyonunu kontrol eden genomik damgalanma (*genomic imprinting*) olayı için de önemli bir rol oynar.
- ***Kodlamayan RNA'lar:*** Çok sayıda kodlamayan uzun RNA (lncRNA) tanımlanmıştır ve bunların birçoğu transkripsiyon düzenleyici olarak işlev görüyor olabilir. Pek çok lncRNA, kromatin modifikasyonunu düzenleyen proteinlerle kompleks oluşturarak ve bu komplekslerin hedef genlere getirilmelerini sağlayarak görev yapar.

RNA İşlenmesi ve Dönüşümü

- ***Ribozomal ve taşıyıcı RNA'ların işlenmesi:*** Ribozomal ve taşıyıcı RNA'lar hem bakterilerde hem ökaryotik hücrelerde, uzun öncül transkriptlerin kesimi ile oluşturulurlar. rRNA'lara metil grupları eklenirken, tRNA'larda çeşitli bazlar modifiye edilir.
- ***Ökaryotlarda mRNA'nın işlenmesi:*** Ökaryotlarda pre-mRNA'lar, kesip-ekleme işlemi ile intronların çıkartılmasına ek olarak, 7-metilguanozin kepin ve 3′ poli-A kuyruğunun eklenmesi ile modifiye edilirler. Bkz. **Animasyon 8.2.**
- ***Kesip-ekleme (splicing) mekanizmaları:*** Nükleer pre-mRNA'ların kesip-ekleme işlemi, proteinler ve küçük nükleer RNA'lardan (snRNA'lar) oluşan ve splaysozom adı verilen büyük komplekslerde gerçekleşir. snRNA'lar, pre-mRNA'ların kesip-ekleme noktalarındaki dizileri tanır ve kesip-ekleme reaksiyonunu katalizler. Bazı mitokondri, kloroplast ve bakteri RNA'ları, kesip-ekleme reaksiyonunun intron dizileri tarafından katalizlendiği bir kendi-kendine kesip-ekleme işlemine uğrarlar. Bkz. **Video 8.3.**
- ***Alternatif kesip-ekleme işlemi:*** Kompleks ökaryotlarda ekzonlar, gen ekspresyonunun doku-spesifik kontrolü için önemli bir mekanizma sağlayan alternatif kesip-ekleme sonucunda, farklı kombinasyonlarda birleştirilebilirler.
- ***RNA düzeltme (editing):*** Bazı mRNA'lar, protein-kodlayan dizilerini değiştiren işlenme olayları ile modifiye edilirler. Bazı protozoalarda, mitokondriyel mRNA'ların düzeltilmesi, moleküldeki birçok noktada U kalıntılarının eklenmesini ve çıkartılmasını kapsar. Memeli hücrelerindeki RNA düzeltme, sitozinin üridine ve adenozinin inozine deaminasyonunu kapsar.
- ***RNA yıkımı:*** İntronlar nükleus içinde yıkılırken, tam açık-okuma çerçevesi olmayan anormal mRNA'lar anlamsız-aracılı mRNA yıkımı ile ortadan kaldırılırlar. Ökaryotik hücrelerdeki fonksiyonel mRNA'lar farklı hızlarda yıkılarak, gen ekspresyonunun kontrolü için ek bir mekanizma sağlarlar. Bazı durumlarda, mRNA yıkımının hızı hücre dışı sinyaller tarafından düzenlenir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

epigenetik kalıtım, Polikomb proteinleri

genomik damgalanma

kodlamayan uzun RNA (lncRNA)

pre-rRNA, pre-tRNA, RNaz P, ribozim

pre-mRNA, mRNP, 7-metilguanozin kep, poli-A kuyruk, poliadenilasyon

splaysozom, küçük nükleer RNA (snRNA), küçük nükleer ribonükleoprotein partikülü (snRNP), kendi-kendine kesip-ekleme

alternatif kesip-ekleme

RNA düzeltme

anlamsız-aracılı mRNA yıkımı

Sorular

1. Bakteriyel RNA sentezinde sigma (σ) faktörlerinin rolü nedir?
2. *E. coli* mRNA'larının sonlanmasındaki temel mekanizma nedir?
3. *lac* represörü *lac* operonunun transkripsiyonunu nasıl etkiler?
4. Biri TATA kutusu, diğeri sadece Inr dizisi içeren iki RNA polimeraz II geninin *in vitro* transkripsiyonu için gerekenleri karşılaştırıyorsunuz. Bu promotörlerden transkripsiyon TBP veya TFIID'ye gereksinim duyar mı?
5. Ökaryotlardaki *cis*-etkili regülatör diziler olarak güçlendiricilerin promotörlerden farkı nedir?
6. Normalde sadece nöronlarda eksprese edilen bir genin güçlendiricisini çalışıyorsunuz. Bir raportör genin bu güçlendiriciye bağlandığı plazmidler nöron hücrelerinde eksprese ediliyorlarken, fibroblastlarda edilmiyorlar. Ancak bu güçlendirici içindeki spesifik bir dizi elemanını mutasyona uğratırsanız, hem fibroblastlarda hem de nöronlarda ekspresyon görüyorsunuz. Bu dizi elemanına hangi tip regülatör proteinin bağlanmasını beklersiniz?
7. Yalıtkanların işlevleri nelerdir?
8. lncRNA'lar transkripsiyonu nasıl düzenlerler?
9. Sp1'in hangi özelliğinden yararlanılarak onun DNA-afinite kromatografisi ile saflaştırılması sağlanmıştır? Saflaştırılan proteinin gerçekten Sp1 olduğuna nasıl karar verirdiniz?
10. Kesip-ekleme işleminden geçmemiş bir pre-mRNA'nın olgun mRNA'ya dönüştürüldüğü *in vitro* bir kesip-ekleme reaksiyonu geliştiriyorsunuz. Bu reaksiyona anti-Sm antiserumu ekleseydiniz, nasıl bir sonuç beklerdiniz?
11. Global deneysel analizde, güçlendiricileri promotörlerden nasıl ayırt edersiniz?
12. snRNP'lerin bileşeni olmayan kesip-ekleme faktörlerinin işlevi nedir?
13. İnsan karaciğerinde ve barsağında, apolipoprotein B'nin iki farklı yapısal ve işlevsel formu nasıl sentezlenir?
14. Anlamsız-aracılı mRNA yıkımı nedir? Bunun hücre için önemi nedir?

Atıf

Hücre

Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar (Her ana bölüm için en önemli anahtar derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Bakterilerde Transkripsiyon

Borukhov, S., J. Lee and O. Laptenko. 2005. Bacterial transcription elongation factors: New insights into molecular mechanism of action. *Molec. Microbial.* 55: 1315-1324. [R]

Gilbert, W. and B. Muller-Hill. 1966. Isolation of the *lac* repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56: 1891-1899. [P]

Jacob, F. 2011. The birth of the operon. *Science* 332:767. [R]

Jacob, F. and J. Monod. 1961. Genetic and regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318-356. [P]

Lawson, C. L., D. Swigon, K. S. Murakami, S. A. Darst, H. M. Berman and R. H. Ebright. 2004. Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 14: 10-20. [R]

Mathew, R. and D. Chetterji. 2006. The evolving story of the ω subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends Microbial.* 14: 450-455. [R]

Mooney, R. A., S. A. Darst and R. Landick. 2005. Sigma and RNA polymera se: an on-again, off-again relationship? *Mol. Cell 20 :* 335-345. [R]

Murakami, K. S. and S. A. Darst. 2003. Bacterial RNA polymerases: The wholo story. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 13: 31-39. [R]

Ptashne, M. and A. Gann. 2002 . Genes and Signals. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Rabinowitz, J. D. and T. J. Silhavy. 2013. Systems biology: Metabolite turns master regulator. *Nature* 500: 283-284. [R]

Richardson, J. P. 2003. Loading Rho to

terminate transcription. *Cell* 114: 157-159. [R]

Wilson, C. J., H. Zhan, L. Swint-Kruse and K. S. Matthews. 2007. The lactose repressor system: paradigms for regulation, allosteric behavior and protein folding . *Cell. Mol. Life. Sci.* 64: 3-16. [R]

Zhang, G., E. A. Campbell, E. A., L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov and S. A. Darst. 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 A resolution. *Cell* 98: 811-824. [P]

Ökaryotik RNA Polimerazlar ve Genel Transkripsiyon Faktörleri

Allen, B. L. and D. J. Taatjes. 2015. The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 155-166. [R]

Buratowski, S. 2009. Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol. Cell* 36: 541-546. [R]

Ebright, R. H. 2000. RNA polymerase: Structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryot ic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.* 304: 687-698. [R]

Goodrich, J. A. and R. Tjian. 2010. Unexpected roles for core promoter recognition factors in cell-type-specific transcription and gene regulation. *Nature Rev. Genet.* 11: 549-558. [R]

Kim, Y.-J. and J. T. Lis. 2005. Interactions between subunits of *Drosophila* Mediator and activator proteins. *Trends Biochem. Sci.* 30: 245-249. [R]

Kornberg, R. D. 2007. The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 12955-12961. [R]

Kuehner, J. N., E. L. Pearson and C. Moore. 2011. Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 1-12. [R]

Malik, S. and R. G. Roeder. 2010. The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nature Rev. Genet.* 11: 761-772. [R]

Matsui, T., J. Segall, P. A. Weiland R. G. Roeder. 1980. Multiple factors are required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 255: 11992-11996. [P]

Richard, P. and J. L. Manley. 2009. Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev.* 23: 1247-1269. [R]

Roy, A. L. and D. S. Singer. 2015. Core promoters in transcription: old problem, new insights. *Trends Biochem. Sci.* 40: 165-171. [R]

Russell, J. and J. C. B. M. Zomerdijk. 2005. RNA polymerase I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem. Sci.* 30: 87-96. [R]

Schramm, L. and N. Hernandez. 2002. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.* 16: 2593-2620. [R]

Weil, P. A., D. S. Luse, J. Segall and R. G. Roeder. 1979. Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* 18: 469-484. [P]

Ökaryotlarda Transkripsiyonun Düzenlenmesi

Buecker, C. and J. Wysocka. 2012. Enhancers as information integration hubs in development: lessons from genomics. *Trends Genet.* 28: 276-284. [R]

De Laat, W. and D. Duboule. 2013. Topology of mammalian developmental enhancers and their regulatory landscapes. *Nature* 502: 499-506. [R]

Espinoza, C. A. and B. Ren. 2011. Mapping higher order structure of chromatin domains. *Nature Genet.* 43: 615-616. [R]

Fuda, N. J ., M. B. Ardehali and J. T. Lis. 2009. Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription *in vivo*. *Nature* 461: 186-192. [R]

Kadonaga, J. T. 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequencespecific DNA binding factors. *Cell* 116: 247-257. [R]

Lonard, D. M. and B. W. O'Malley. 2005. Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem. Sci.* 30: 126-132. [R]

Maksimenko, O. and P. Georgiev. 2014. Mechanisms and proteins involved in long-distance interactions. *Front. Genet.* 5:28 [R]

Ong, C.-T. and V. G. Corces. 2014. CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nature Rev. Genet.* 15: 234-246. [R]

Price, D. H. 2010. Regulation of RNA polymerase II elongation by c-Myc. *Cell* 141: 399-400. [R]

Shlyueva, D., G. Stampfel and A. Stark. 2014. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nature Rev. Genet.* 15: 272-286. [R]

Kromatin ve Epigenetik

Badeaux, A. I. and Y. Shi. 2013. Emerging roles for chromatin as a signal integration and storage platform. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14:211-224. [R]

Brownell, J. E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi , D. G. Edmondson, S. Y. Roth and C. D. Allis. 1996. *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84: 843-851. [P]

Calo, E. and J. Wysocka. 2013. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol. Cell* 49: 825-837. [R]

D'Urso, A. and J. H. Brickner. 2014. Mechanisms of epigenetic memory. *Trends Genet.* 30: 230-236. [R]

Fatica, A. and I. Bozzoni. 2014. Long noncoding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Rev. Genet.* 15: 7-21. [R]

Guttman, M, J. and 16 others. 2011. lin-cRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 477: 295-300. [P]

Ho, L. and G. R. Crabtree. 2010.

Chromatin remodeling during development. *Nature* 463: 474-484 . [R]

Holoch, D. and D. Moazed. 2015. RNAmediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Rev. Genet.* 16: 71-84. [R]

Iyer, M. K. and 18 others. 2015. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nature Genet* . 47: 199-208. [P]

Jones, P. A. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Rev. Genet.* 13: 484-492. [R]

Kugel, J. F. and J. A. Goodrich. 2011. Noncoding RNAs: key regulators of mammalian transcription. *Trends Biochem. Sci.* 37: 144-151. [R]

Moazed, D. 2011. Mechanisms for the inheritance of chromatin states. *Cell* 146: 510-518. [R]

Piccolo, F. M. and A. G. Fisher. 2014. Getting rid of DNA methylation. *Trends Cell Biol.* 24: 136-143. [R]

Rinn, J. L. and H. Y. Chang. 2012. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Ann. Rev. Biochem.* 81: 145-166. [R]

Saha, A., J. Wittmeyer and B. R. Cairns. 2006. Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 437-447. [R]

Schwartz, Y. B. and V. Pirrotta. 2013. A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. *Nature Rev. Genet.* 14: 853-864. [R]

Taunton, J., C. A. Hassig and S. L. Schreiber. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272: 408-411. [P]

Wang, K. C. and H . Y. Chang. 2011. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol. Cell* 43: 904-914. [R]

Wu, H. and Y. Zhang. 2014. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* 156: 45-68. [R]

Yang, L., J. E. Froberg and J. T. Lee. 2014. Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world . *Trends Biochem. Sci.* 39: 35-43. [R]

RNA İşlenmesi ve Dönüşümü

Blanc, V. and N. O. Davidson. 2003. C-to-U RNA editing: Mechanisms leading to genetic diversity. *J. Biol. Chem.* 278: 1395-1398 . [R]

Chen, M. and J . L. Manley. 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 741-754. [R]

Evans, D., S. M. Marquez and N. R. Pace. 2006. RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends Biochem. Sci.* 31: 333-341. [R]

Fica, S. M., N. Tuttle, T. Novak, N.-S. Li, J. Lu, P. Kooda thingal, Q. Dai, J. P. Staley and J. A. Piccirilli. 2013. RNA catalyses nuclear pre-mRNA splicing. *Nature* 503: 229-234. [P]

Garneau, N. L., J. Wilusz and C. J. Wilusz. 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 113-126. [R]

Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman and D. P. Bartel. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466 : 835-841. [P]

Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace and S. Altman. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35: 849-857. [P]

Haugen, P., D. M. Simon and D. Bhattacharya. 2005. The natural history of group I introns. *Trends Genet.* 21: 111-119. [R]

Hundley, H. A. and B. L. Bass. 2010. ADAR editing in double-stranded UTRs and other noncoding RNA sequences. *Trends Biochem. Sci.* 35: 377-383 [R]

Kornblihtt, A. R., I. E. Schor, M. Allo, G. Dujardin, E. Petrillo and M. J. Munoz. 2013. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 153-165. [R]

Kruger, K., P. J. Grabowski, A. Zaug, A. J. Sands, D. E. Gottschling and T. R. Cech. 1982. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena. Cell* 31: 147-157. [P]

Kuehner, J . N., E. L. Pearson and C. Moore. 2011. Unrave lling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 1-12. [R]

Li, J. B. and G. M. Church. 2013. Deciphering the functions and regulation of brainenriched A-to-I RNA editing. *Nature Neurosci.* 16: 1518-1522. [R]

Mitchell, S. F. and R. Parker. 2014. Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Mol. Cell* 54: 547-558. [R]

Nilsen, T. W. and B. R. Graveley. 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463: 457-463. [R]

Padgett, R. A., S. M. Matmt, J. A. Steitz and P. A. Sharp. 1983. Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* 35: 101-107. [P]

Proudfoot, N .J. 2011. Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.* 25:1770-1782.

Richard, P. and J. L. Manley. 2009. Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev.* 23: 1247-1269. [R]

Schmucker, D. 2007. Molecular diversity of Dscam: recognition of molecular identity in neuronal wiring. *Nature Rev. Neurosci.* 8: 915-920. [R]

Schoenberg, D. R. and L. E. Maquat. 2012. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Rev. Genet.* 13: 246-259. [R]

Wahl, M. C., C. L. Will and R. Luhrmann. 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136: 701-718. [R]

BÖLÜM 9

Protein Sentezi, İşlenmesi ve Düzenlenmesi

mRNA'nın Translasyonu 317

Protein Katlanması ve İşlenmesi 338

Protein Fonksiyonunun Düzenlenmesi 350

Protein Yıkımı 357

Moleküler Tıp
Alzheimer Hastalığı 342

Anahtar Deney
Protein-Tirozin Kinazın Keşfi 353

Transkripsiyon ve RNA işlenmesinden sonraki aşama translasyondur. Proteinlerin sentezi mRNA kalıpları tarafından yönlendirilir. Proteinler genomik DNA da kodlanan bilgilerle yönlendirilen çok sayıda işlemi gerçekleştirmede aktif rol oynarlar. Bu nedenle protein sentezi gen ekspresyonunun son aşamasıdır. Bununla birlikte, mRNA'nın translasyonu fonksiyonel protein oluşumunun ilk aşamasıdır. Polipeptid zincirleri aktif formlarına çevrilmeden önce çeşitli işlenme aşamalarından geçip katlanarak uygun üç boyutlu konformasyonunu almak zorundadır. Bu işlenme aşamaları, özellikle ökaryotlarda, farklı proteinlerin ayrılıp hücre içindeki uygun hedeflere varması ile yakından ilişkilidir.

Gen ekspresyonu sadece transkripsiyon aşamasında değil, (bkz. Bölüm 8) translasyon aşamasında da kontrol edilmektedir ve bu kontrol hem ökaryot hem de prokaryot hücrelerde düzenlenme önemli bir unsurudur. Bunun da ötesinde hücrede protein aktivitelerini kontrol eden mekanizmalar büyük önem taşımaktadır. Proteinlerin çoğu sentez edildikten sonra hücre dışından gelen sinyallere cevap olarak kovalent modifikasyonla veya diğer moleküllere bağlanarak düzenlenebilirler. Ek olarak hücre içinde proteinlerin düzeyi protein yıkımının hızlarının değişmesi ile de kontrol edilebilmektedir. Hücre içi proteinlerin miktar ve aktivitelerinin bu çok yönlü kontrolü sonuçta hücre davranışını tüm yönleri ile düzenler.

mRNA'nın Translasyonu

Proteinler evrim boyunca iyi korunmuş bir süreçle mRNA kalıplarından sentezlenirler (Bölüm 4'de gözden geçirildi). Tüm mRNA'lar 5′ den 3′ yönüne doğru okunurlar ve polipeptid zincirleri de amino ucundan karboksil ucuna doğru sentezlenirler. Her amino asit mRNA'da üç baz (kodon) tarafından tanımlanan, hemen hemen evrensel olan bir genetik koda göre belirlenir. Protein sentezinin temel mekanizmaları da tüm hücrelerde aynıdır: Translasyon, tRNA'nın mRNA ve proteine katılan amino asitler arasında adaptör rol oynaması ile ribozomlarda gerçekleşir. Böylece protein sentezi, translasyon için gerekli olan proteinlerin etkileşimi kadar üç tip RNA molekülü (mRNA kalıpları, tRNA ve rRNA) arasındaki etkileşimi de kapsar.

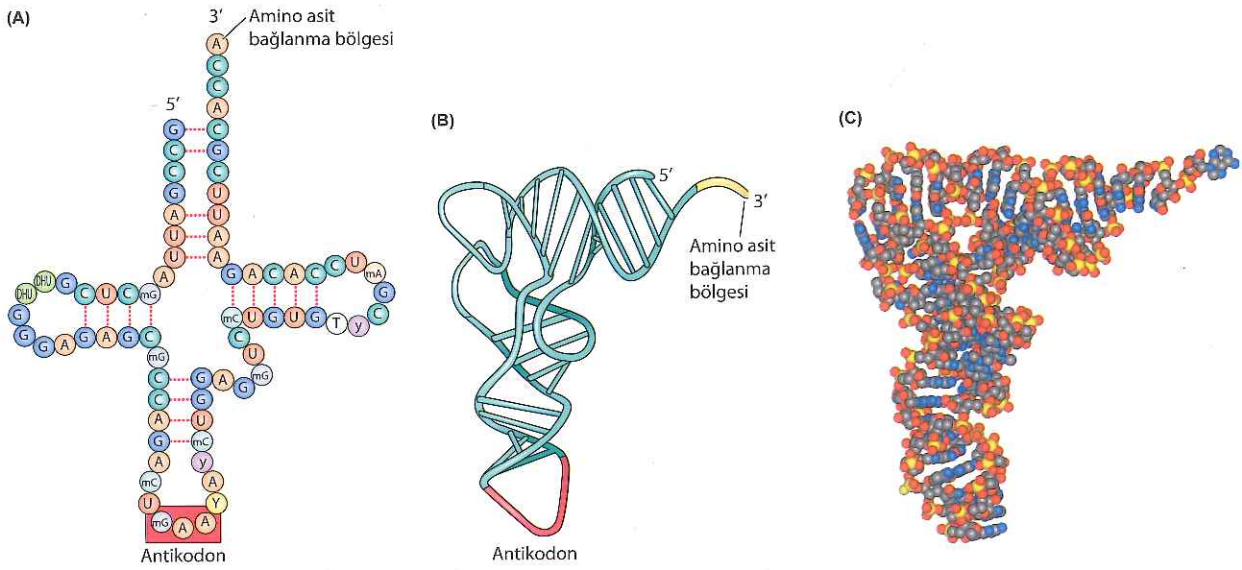
Taşıyıcı RNA'lar

Translasyon sırasında 20 amino asidin her birinin mRNA kalıbı üzerindeki bunlara karşılık gelen kodonlara göre dizilmeleri gerekir. Tüm hücreler bu süreç için adaptör rolü oynayan çeşitli **tRNA**'ları bulundururlar. Tahmin edileceği gibi, protein sentezindeki genel fonksiyonlarına uygun olarak farklı tRNA'lar benzer yapıya sahiptirler. Bununla birlikte, doğru amino asidin bağlanmasını ve

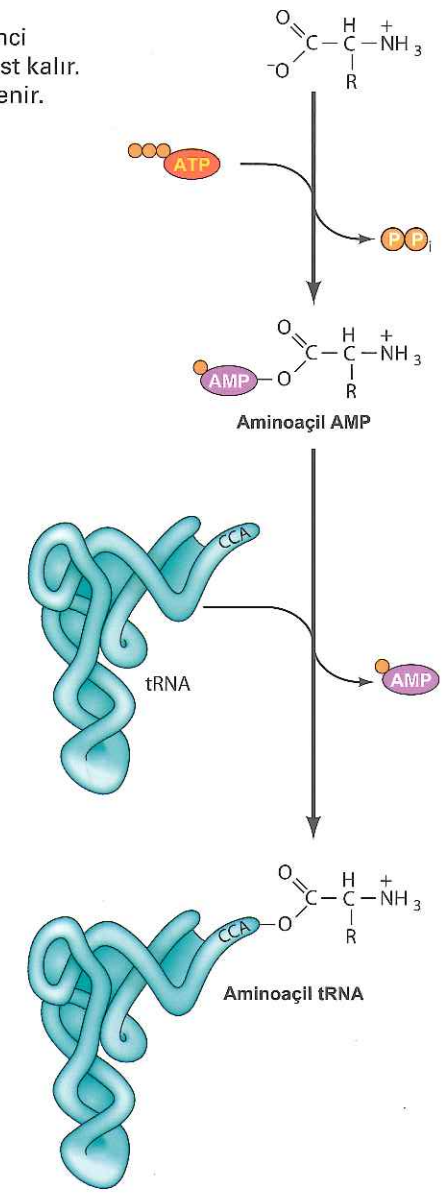
mRNA'daki uygun kodonlara dizilmesini sağlayacak kendine özgü tanımlayıcı diziler de içerir.

Taşıyıcı RNA'lar yaklaşık 70 ila 80 nükleotid uzunluğundadır ve molekül içinde farklı bölgeler arasındaki komplementer baz eşleşmesi ile ortaya çıkan karakteristik yonca yaprağı yapısına sahiptir (Şekil 9.1) X-ışını kristallografisi çalışmaları tüm tRNA'ların, daha sonra, translasyon sürecinde ribozomlara uygun yerleşim için gerekli olan L şeklinde bir katlanma yaptığını göstermiştir. tRNA'nın adaptör fonksiyonu molekülün iki farklı bölgesini içerir. Tüm tRNA'ların 3′ ucunda CCA dizini bulunur ve amino asitler terminal adenozinin ribozuna kovalent olarak bağlanırlar. Daha sonra mRNA kalıbı katlanmış tRNA'nın diğer ucunda yer alan ve uygun kodona tamamlayıcı baz eşleşmesi ile bağlanan **antikodon** halkası tarafından tanınır.

Doğru kodlanmış bir amino asidin proteine katılımı kodon-antikodon baz eşleşmesinin özgüllüğü kadar, her amino asidin uygun tRNA'ya eklenmesine de bağlıdır. Amino asitlerin özgül tRNA'lara bağlanması, 1957 yılında Mahlon Hoagland ve Paul Zamecnik tarafından keşfedilen ve **aminoaçil tRNA sentetaz** adı verilen bir grup enzim aracılığı ile gerçekleşir. Bu 20 enzimin her biri amino asitlerin bağlanması gereken doğru tRNA'yı (veya tRNA'ları) tanıdığı gibi, tek bir amino asidi tanır. Reaksiyon iki aşamada ilerler (Şekil 9.2). İlk olarak, amino asit, aminoaçil AMP sentetaz ara ürünü vermek üzere ATP ile reaksiyona girer ve aktive olur. Aktive olmuş amino asit daha sonra tRNA'nın 3′ ucuna bağlanır. Aminoaçil tRNA sentetaz, hem amino asidi hem de doğru tRNA'ları belirleyen, özgül dizileri tanıyan çok seçici bir enzim olmak zorundadır. Bazı durumlarda, amino asitlerin yüksek doğrulukta tanınması, yanlış oluşmuş aminoaçil AMP'ların reaksiyonun ikinci aşaması olan tRNA'ya



Şekil 9.1 tRNA'ların yapısı Maya fenil alanin tRNA'sının tamamlayıcı baz eşleşmesini gösteren açık "yonca yaprağı" şekli görülmektedir (A). Modifiye bazlar; mG, metil guanozin; mC, metil sitozin; DHU, dihidroüridin; T, ribotimin; Y, modifiye bir pürin (genellikle adenozin) ve ψ psödoüridini simgelemektedir. Molekülün katlanmış hali (B)'de ve üç boyutlu modeli de (C)'de görülmektedir.



Şekil 9.2 Amino asitlerin tRNA'ya takılması Reaksiyonun ilk aşamasında amino asitler aminoaçil AMP ara bileşiğini vermek üzere AMP ile birleşir. İkinci aşamada amino asit, alıcı tRNA'nın 3'CCA ucuna transfer olur ve AMP serbest kalır. Reaksiyonun her iki aşaması da, aminoaçil tRNA sentetaz tarafından katalizlenir.

bağlanmak yerine hidrolize edilmesi şeklinde işleyen, yanlışını düzeltme (proofreading) fonksiyonunun sonucudur. Doğru tRNA'nın aminoaçil tRNA sentetaz tarafından tanınması da oldukça seçicidir; sentetaz her tRNA türünü belirleyen özgül nükleotid dizilerini (çoğu kez antikodon da dahil olmak üzere) tanır.

Bir amino asit tRNA'ya bağlandıktan sonra mRNA kodonu ile tRNA'nın antikodonu arasında komplementer baz eşleşmesi ile kalıp mRNA üzerine bağlanırlar. Kodon-antikodon baz eşleşmesi daha önceki bölümlerde sözü edilen standart A-U ve G-C baz eşleşmesinden daha zayıftır. Kodon-antikodon tanımasındaki bu alışılmadık baz eşleşmesinin önemi genetik kodun fazlalığı ile ilgilidir. Olası 64 kodonun üçü translasyonun bitiş sinyali olan dur kodonudur, geri kalan 61 kodonu amino asit belirler (bkz. Tablo 4.1). Böylece, amino asitlerin büyük bölümü birden fazla kodon tarafından tanımlanır. Bu fazlalık birçok amino asidin birden fazla tRNA türüne bağlanmasına neden olur. Örneğin *E. coli*, 20 farklı amino asit için alıcı olan 40 farklı tRNA içerir. Ayrıca, bazı tRNA'lar, tRNA'daki antikodon ve buna karşı gelen bazı kodonların üçüncü pozisyonu arasındaki standart olmayan baz eşleşmesi (Wobble olarak bilinir) nedeni ile mRNA üzerinde birden fazla kodonu tanıyabilirler (**Şekil 9.3**). Bu pozisyondaki gevşek baz eşleşmesi kısmen G-U baz çiftinden, kısmen de, tRNA'nın işlenmesi sırasında antikodondaki guanozinin inozine modifikasyonu sonucu ortaya çıkar (bkz. Şekil 8.43). İnozin üçüncü pozisyonda C, U veya A'dan herhangi biri ile baz çifti yapabilir, böylece antikodonda bulunması halinde tek bir tRNA'nın mRNA kalıbındaki 3 farklı kodonu tanımasına imkan verir.

Ribozom

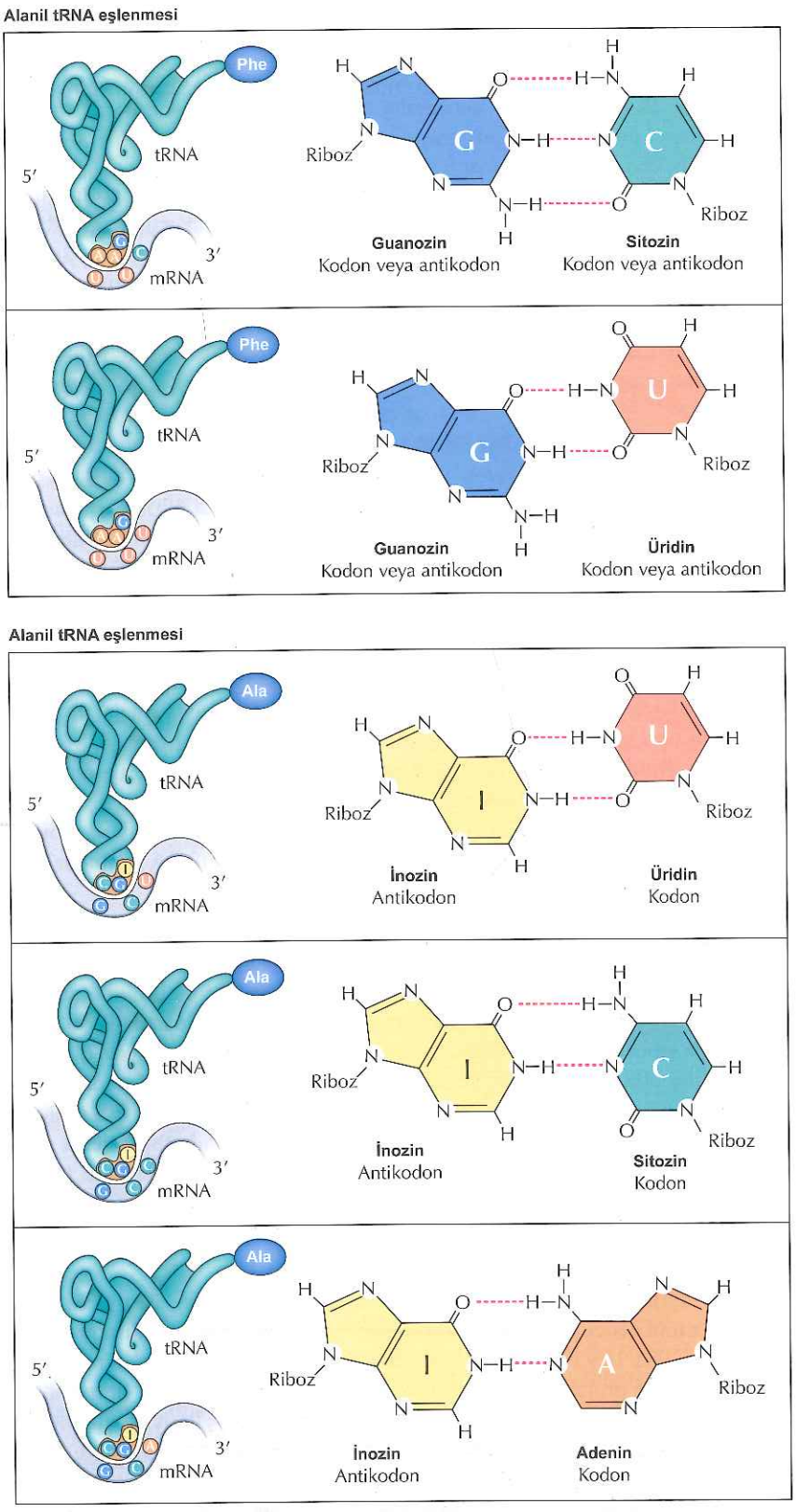
Ribozomlar hem ökaryot hem de prokaryot hücrelerde protein sentez bölgeleridir. İlk kez hücre özütlerinin ultrasantrifügasyonunda partiküller olarak fark edilen ribozomlar; bakteri ribozomları 70S ve daha büyük olan ökaryot hücredekiler 80S olmak üzere, genellikle çökme hızlarına göre adlandırılırlar. Prokaryot ve ökaryot ribozomların her ikisi de, her biri karakteristik protein ve **rRNA** içeren iki ayrı alt birimden oluşmaktadır. Aslında, hücrelerin çok sayıda ribozom içermesi protein sentezinin hücre metabolizmasındaki temel öneminin bir göstergesidir. Örneğin, *E. coli* kuru hücre ağırlığının yaklaşık %25'ine karşı gelen 20,000 dolayında ve hızlı büyüyen memeli hücreleri ise, yaklaşık 10 milyon ribozom içerirler.

Bazı ayrıntılarda farklar olmakla birlikte, ökaryot ve prokaryot ribozomlarının genel yapısı benzerdir (**Şekil 9.4**). *E. coli* ribozomlarının küçük alt birimi (30S) 16S rRNA ve 21 proteinden; büyük alt birim (50S) 23S ve 5S rRNA ile 34 proteinden oluşur. Her ribozom, 50S alt birimde dört kopya halinde bulunan bir protein hariç, rRNA ve proteinlerden tek kopya bulundurur. Ökaryot ribozomlarının alt birimleri prokaryotlardaki karşılıklarına göre daha büyüktür ve daha fazla protein içerirler. Ökaryot ribozomların küçük alt birimi (40S) 18S rRNA ve yaklaşık 33 proteinden, büyük alt birim (60S) 28S, 5.8S

Bilgi İçin

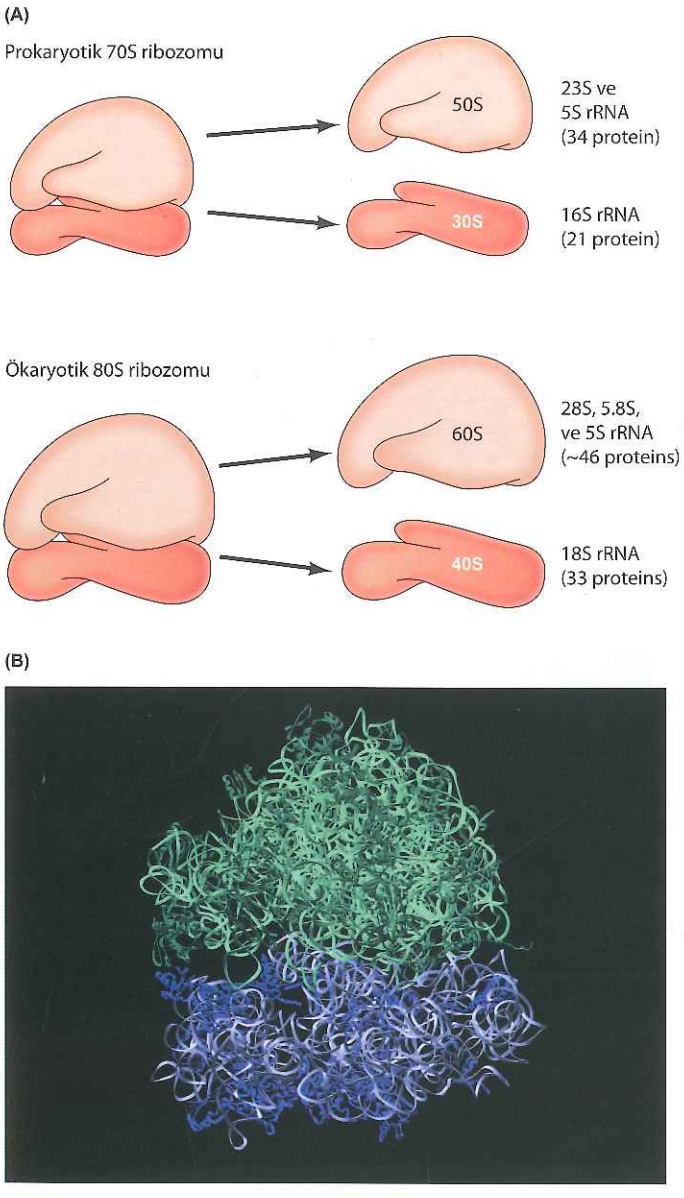
Bazı durumlarda 21. amino asit olarak adlandırılan selenosisteinler dur kodonuna yerleşmiştir. Selenosistein, insanlar da dahil olmak üzere çeşitli organizmaların proteinlerinde bulunan selenyum içeren bir amino asittir. Diğer bir modifiye amino asit pirolizin de dur kodonuna yerleşebilir. Pirolizin bazı arkeabakterilerin proteinlerinde bulunan ve metan üretiminde önemli olan bir lizin türevidir.

Şekil 9.3 Standart dışı kodon-antikodon baz eşleşmesi Kodonun üçüncü pozisyonundaki baz eşleşmesi gevşektir, G'nin U ile, antikodondaki inozinin (I) U, C veya A ile baz çifti oluşturmasına imkan verir. Fenil alanin tRNA'sının UUC veya UUU ve alanil tRNA'sının GCU, GCC veya GCA'yı tanıması anormal baz eşleşmesine iki örnek olarak verilmiştir.



ve 5S rRNA ile yaklaşık 46 proteinden oluşmaktadır. Boyutlarının büyüklüğü ve karmaşıklıklarından dolayı, ribozomların X-ışını kristallografisi ile yüksek çözünürlükte yapısal analizleri 2000 yılında 30S ve 50S alt birim yapılarının ilk rapor edilişine kadar başarılamamıştır. Ökaryotik ribozomların kristal yapısı, ilk olarak 2010 yılında izlendi. Aşağıda tartışıldığı gibi, ribozomların yapısının atomik düzeyde anlaşılmasının ribozomların fonksiyonunu anlamamızda büyük etkisi olmuştur.

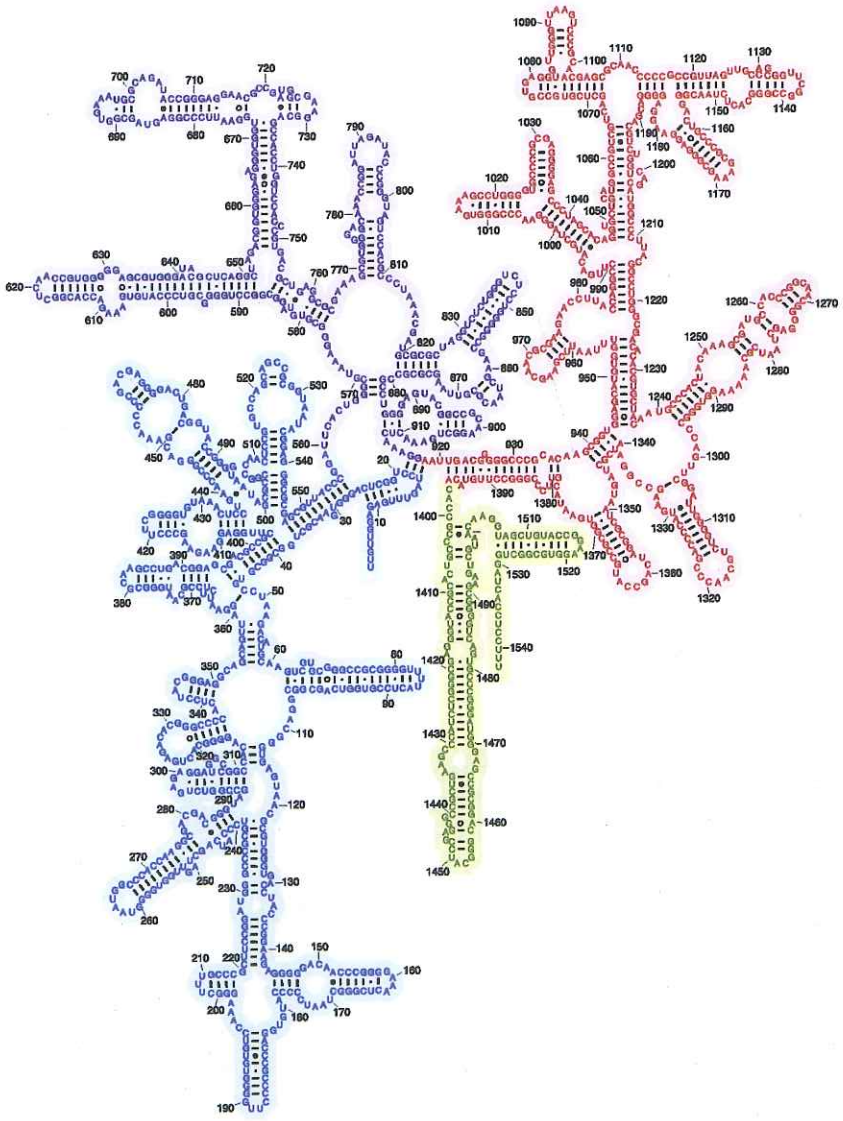
Ribozomların önemli bir özelliği, *in vitro* koşullarda RNA ve protein bileşenlerinin kendiliğinden bir araya gelmesiyle yeniden oluşabilmeleridir. 1968 yılında ilk kez Masayasu Nomura tarafından tanımlandığı gibi, saflaştırılmış ribozomal proteinler ve rRNA'lar uygun şartlar altında bir arada karıştırıldığı zaman fonksiyonel ribozom tekrar oluşmaktadır. Ribozomun montajı *in vivo* koşulda (özellikle ökaryot hücrelerde) çok daha karmaşık



Şekil 9.4 Ribozom yapısı (A) Prokaryotik ve ökaryotik ribozomların bileşenleri. Sağlam prokaryotik ve ökaryotik ribozomlar ultrasantrifüjdeki çökme hızları baz alınarak sırası ile 70S ve 80S olarak adlandırılırlar. Ribozomal proteinler ve rRNA'lardan oluşan alt birimlerden meydana gelir. (B) 70S ribozomun yüksek çözünürlüklü X-ışını kristal yapısı. 30S alt birim mavi (rRNA açık mavi, ribozomal proteinler koyu mavi) ve 50S alt birim yeşil (rRNA açık yeşil, ribozomal proteinler koyu yeşil). (B, after R. M. Voorhees, A. Weixlbaumer, D. Loakes, A. C. Kelley, and V. Ramakrishnan, 2009. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 528.)

olmakla birlikte, *in vitro* olarak ribozomların kendiliğinden yapılanması rRNA ve her bir proteinin rolünü analiz etmeye olanak sağlayan bir deneysel araç olmuştur.

tRNA'lar gibi rRNA'lar da komplementer baz eşleşmesi ile kendilerine özgü sekonder yapı oluştururlar (**Şekil 9.5**). Daha sonra rRNA'lar ribozomal proteinlerle bağlanarak daha ileri üç boyutlu yapılara katlanırlar. Başlangıçta, rRNA'ların sadece ribozomal proteinlerin bir araya gelmesi için iskelet oluşturarak yapısal rol oynadığı düşünüldü. Bununla birlikte diğer RNA moleküllerinin katalitik aktivitelerinin (örnek olarak; RNaz P ve kendi kendini uzaklaştıran intronlar Bölüm 8'da tartışıldı) keşfedilmesi ile rRNA'ların



Şekil 9.5 16S rRNA'nın yapısı Komplementer baz eşleşmesi, kendine özgü sekonder yapısını oluşturur. (M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. H. Eamest, J. H. D. Cate and H. F. Noller, 2001. *Science* 292: 883'den)

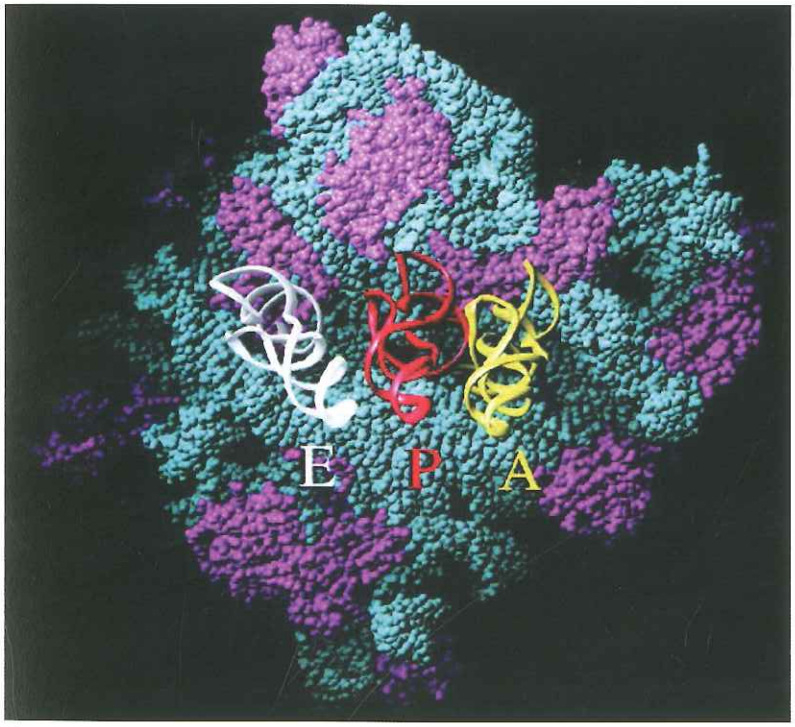
da katalitik rolü olabileceği düşünülmüştür. Bu hipotezle uyumlu olarak, fonksiyonel ribozomların *in vitro* koşulda yapılanması için rRNA'ların kesinlikle gerekli olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan bazı proteinlerin çıkarılması ribozom aktivitelerini düşürmüş ancak tamamen yok etmemiştir.

Ribozomal RNA'ların katalitik aktiviteleri ile ilgili ilk kanıt, 1992 yılında Harry Noller ve arkadaşlarının deneylerinden geldi. Bu araştırmacılar büyük ribozomal alt birimde standart protein izolasyonu işlemleri ile ribozomal proteinlerin yaklaşık %90'ının uzaklaştırılması halinde bile peptid bağı oluşumunun (peptidil transferaz reaksiyonu) katalizlenebildiğini gösterdiler. Bunun aksine, RNaz muamelesinin peptid bağı oluşumunu tamamen yok etmesi peptid bağı oluşumunun RNA tarafından katalizlenen bir reaksiyon olduğu hipotezine güçlü bir destek sağladı. Ancak, bazı ribozomal proteinlerin RNA'yı bozmadan uzaklaştırılamaması mümkün olamadığından, ribozomal proteinlerin peptid bağı oluşumunda katalizleyici olma olasılığı tamamen reddedilemedi.

Protein sentezinin rRNA tarafından katalizlendiği konusunda şüphe götürmez bir kanıt, 2000 yılında Peter Moore, Thomas Seitz ve arkadaşları tarafından bildirilen, 50S ribozomal alt biriminin yüksek çözünürlüklü yapısal analizlerinden elde edildi (**Şekil 9.6**). Ribozom yapısının atom düzeyindeki görüntüsü, peptidil transferaz reaksiyonunun gerçekleştiği bölgede ribozomal proteinlerin kesinlikle bulunmadığını ve peptid bağı oluşumunun katalizinden

Bilgi İçin

Ribozomal RNA dizileri çok korunmuş olmakla beraber evrim sürecinde değişimler meydana gelmiştir. rRNA dizilerinin karşılaştırılması türler arasındaki evrimsel ilişkiyi belirlemede güçlü bir araçtır.



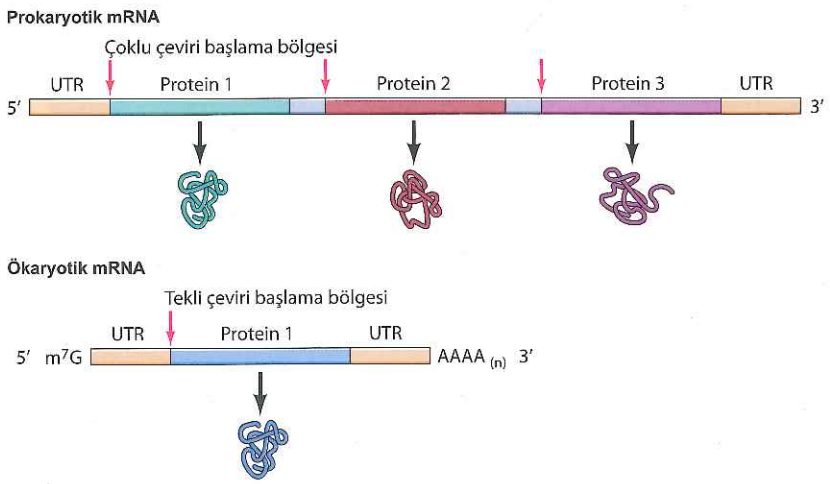
Şekil 9.6 50S ribozomal alt birimin yapısı A (aminoaçil), P (peptidil) ve E (çıkış=exit) bölgelerine 3 tRNA bağlanmış bir bir ribozomun 50S alt birimine ait, yüksek çözünürlüklü modeli (bkz. Şekil 9.13). Ribozomal proteinler mor ve rRNA mavi olarak görülmektedir. (P. Nissen ve arkadaşları, 2000. *Science* 289: 920'den alındı).

rRNA'nın sorumlu olduğunu açıkça gösterdi. Yapısal analizler serin proteazlar tarafından yapılan peptid bağı hidrolizi reaksiyonunun tersine benzer bir şekilde aktif bölgedeki rRNA'ların da proton transfer reaksiyonu ile peptid bağı oluşumunu katalizleyebileceğini düşündürmektedir. İleri sürülen bu mekanizmanın doğruluğunun saptanması için daha ileri çalışmalar gerekmekle birlikte, protein sentezinin temel reaksiyonunun ribozomal RNA tarafından katalizlendiği fikri iyice yerleşmiştir. Ribozomların primer katalitik birimi olması gereken ribozomal proteinlerin ise, büyük ölçüde yapısal rol oynadığı düşünülmektedir.

Ribozomal RNA'nın peptidil transferaz reaksiyonuna doğrudan katılmasının çok önemli evrimsel sonuçları da vardır. RNA'nın kendini kopyalayabilen ilk makromolekül olduğu düşünülmektedir (bkz. Bölüm 1). Bu kavram, RNA substratlarının söz konusu olduğu reaksiyonların, RNaz P ve kendini kesip çıkaran intronlar gibi ribozimler tarafından katalizlenmesi ile güçlü bir şekilde desteklenmiştir. rRNA'nın peptid bağı oluşumundaki rolü RNA'ların katalitik aktivitesini, kendini eşlemekten protein sentezine doğrudan katılıma kadar genişletmiştir. İzleyen çalışmaların, *Tetrahymena* rRNA riboziminin, amino asitlerin RNA'ya bağlanmasını da katalizleyebildiğini göstermesi, orijinal aminoaçil tRNA sentetazların protein yerine RNA'lar olma olasılığını güçlendirimiştir. RNA moleküllerinin kendilerini eşlemeleri yanıda protein sentezi için gerekli olan reaksiyonları da katalizleme yetenekleri hücrelerin evrimini anlamada önemli bir köprü oluşturmaktadır.

Mesajcı RNA'nın organizasyonu ve translasyonun başlaması

Her ne kadar prokaryot ve ökaryot hücrelerde protein sentez mekanizmaları benzerse de, özellikle mRNA kalıbı üzerinde polipeptid zinciri sentezinin

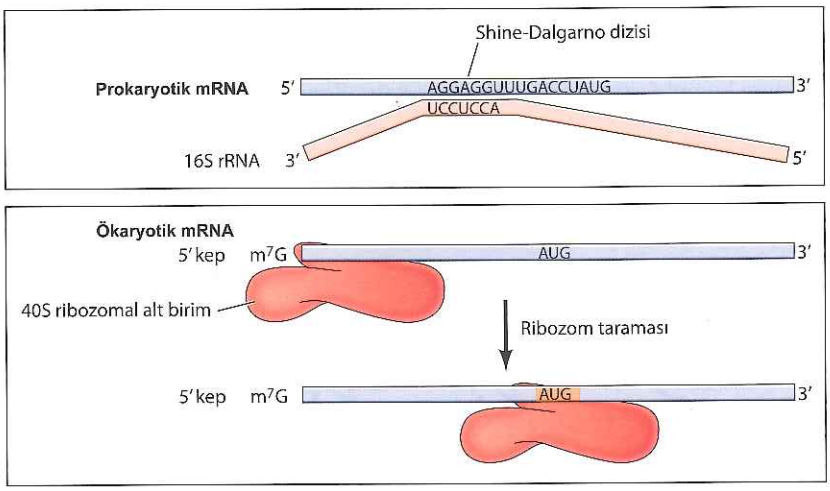


Şekil 9.7 Prokaryot ve ökaryot mRNA'ları Prokaryot ve ökaryot mRNA'larının her ikisi de, 5′ ve 3′ uçlarında proteine çevrilmeyen (UTR) bölgeler içerir. Ökaryot mRNA'sı aynı zamanda 5′ 7-metilguanozin (m^7G) kep ve 3′ poli-A kuyruğu içerir. Prokaryot mRNA'ları genellikle polisistroniktir: Her biri bağımsız başlama bölgesi ile proteine çevrilen bir çok protein kodlar. Ökaryot mRNA'ları genellikle monosistroniktir, tek bir protein kodlarlar.

başladığı pozisyonu tanımlayan sinyaller gibi bazı farklar da mevcuttur (Şekil 9.7). Çeviri 5′ ucunda basit bir şekilde değil özel başlama bölgelerinden başlar. Bu nedenle hem prokaryot hem de ökaryot hücrelerde 5′ terminal kısmı, kodlamayan diziler içerir ve proteine **çevrilmeyen 5′ bölgesi (UTR)** olarak adlandırılır. Ökaryot mRNA'lar genellikle tek bir polipeptid zinciri kodlar ancak prokaryot mRNA'ları ayrı başlama bölgelerinden bağımsız olarak sentezlenen birçok polipeptid kodlar. Örneğin, *E. coli lac* operonu aynı mRNA'dan proteine çevrilecek olan üç genden oluşur (bkz. Şekil 8.7) Tek polipeptid kodlayan mRNA'lar **monosistronik**, birden fazla polipeptid kodlayan mesajcı RNA'lar ise **polisistronik** olarak adlandırılır. Hem prokaryot hem de ökaryot mRNA'lar, proteine çevrilmeyen 3′ bölgesi ile sonlanırlar.

Hem prokaryot hem de ökaryot hücrelerde çeviri genellikle, daima AUG tarafından kodlanan metionin amino asidi ile başlar. GUG gibi alternatif başlama kodonları bazen bakteriler tarafından kullanılır, ancak bu kodonlar polipeptid zincirinin başında oldukları zaman normalde kodladıkları amino asit yerine (GUG normalde valin kodlar) metiyonin katılımını yönlendirirler. Ökaryotlarda modifiye olmamış metiyonin protein sentezini başlatırken (ribozomları bakterininkine benzeyen mitokondri ve kloroplastlar hariç) bakterilerin çoğunda protein sentezi modifiye metionin (*N*- formilmetionin) ile başlar.

Monosistronik ve polisitronik mRNA'ların farklı işlevleriyle uyumlu olarak, prokaryot ve ökaryot hücrelerde başlama kodonlarını tanımlayan sinyaller de farklıdır (Şekil 9.8). Bakterilerde başlama kodonlarından önce, 16S rRNA'nın 3′ ucuna yakın bir komplementer dizi ile baz eşleşmesi oluşturarak mRNA'yı translasyon için ribozomlar üzerine yerleştiren özgün bir dizi (John Shine ve Lynn Dalgarno'nun keşiflerinden sonra **Shine–Dalgarno dizileri** olarak adlandırıldılar) yer alırlar. Bu baz eşleşmesi etkileşimi bakteri kromozomlarının yalnızca mRNA'nın 5′ucunda değil, aynı zamanda polisistronik mesajların



Şekil 9.8 Translasyonun başlama sinyalleri Prokaryot mRNA'sında başlama bölgesi, AUG başlama kodonunun önünde yer alan Shine-Dalgarno dizileri ile karakterizedir. Shine-Dalgarno dizileri ve 16S rRNA'nın 3′ucu yakınında komplementer diziler arasındaki baz eşleşmesi mRNA'yı ribozom üzerine yerleştirir. Buna karşılık, ökaryot mRNA'sı 40S ribozomal alt birime 5′ 7-metilguanozin kep ile bağlanır. Daha sonra ribozom, mRNA'yı, başlama kodonu AUG'yi buluncaya kadar tarar.

internal başlama bölgelerinde de translasyonu başlatmasına olanak verir. Bunun aksine ribozomlar ökaryot mRNA'yı 5′ ucundaki 7-metilguanozin 'kep' bölgesine bağlanarak tanırlar (bkz. Şekil 8.44). Daha sonra, ribozomlar 5′ kep bölgesinden aşağıya doğru AUG kodonunu buluncaya kadar tararlar. AUG etrafındaki diziler başlama kodunun etkinliğini değiştirebilir, bazı durumlarda mRNA'daki ilk AUG kodonu atlanır ve çeviri daha ilerideki AUG'den başlar.

mRNA üzerinde, içeride bir pozisyonda, ribozomun bağlanarak translasyonu başlatacağı internal ribozom giriş bölgelerinin çeşitli viral ve bazı hücresel RNA'larda da bulunduğu hatırda tutulmalıdır. Daha sonraki bölümde tartışılacağı üzere, bu alternatif başlama mekanizması hücrelerin stres şartları altında iken 5′ kep normal başlama fonksiyonlarının inhibe edilmesi ile, bazı mRNA'ların seçici olarak translasyonuna olanak sağlamak olduğu düşünülmektedir

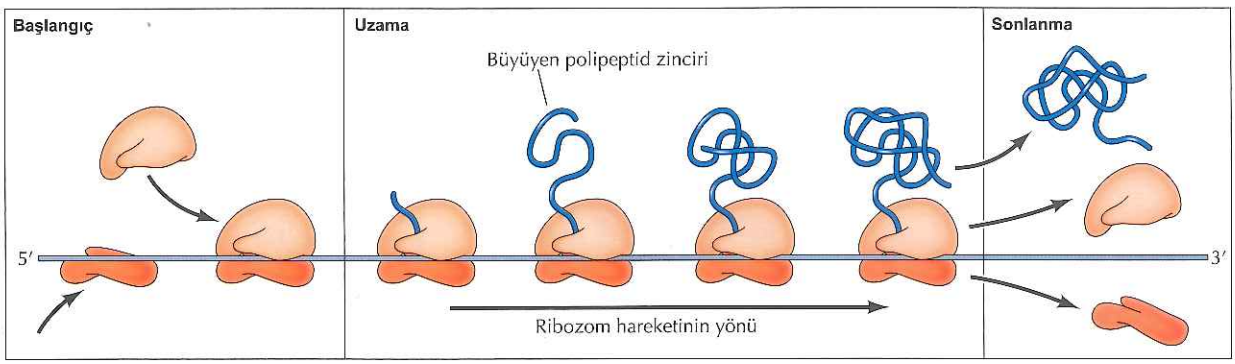
Animasyon 9.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a9.1
Translasyon Translasyon RNA tarafından yönlendirilmiş polipeptid sentezidir.

Translasyon süreci

Proteine çevrim (translasyon) genellikle; başlama, uzama ve sonlanma olmak üzere üç aşamada gerçekleşir (**Şekil 9.9**). Hem prokaryot hem de ökaryotlarda başlangıç evresinin ilk aşaması mRNA'nın ve özgül başlatıcı metionil tRNA'nın küçük ribozomal alt birime bağlanmasıdır. Daha sonra polipeptid zincirinin uzamasının devam ettirecek fonksiyonel ribozomu oluşturacak büyük ribozomal alt birim bu komplekse katılır. Translasyon sürecenin çeşitli aşamalarında çok sayıda özgül ribozomal olmayan proteinlere de gereksinim duyulur (**Tablo 9.1**).

Video 9.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v9.1
mRNA Translasyonu Translasyon sırasında, mRNA bir proteine özgü amino asid dizisini oluşturmak için ribozom tarafından okunur.

Bakteride translasyon başlangıç evresi, iki **başlangıç faktörünün** IF-1 ve IF-3, 30S ribozomal alt birime bağlanmasıyla başlar (**Şekil 9.10**). Üçüncü başlangıç faktörü (GTP'ye bağlı olan başlatma faktörü), mRNA ve *N*-formilmetionil tRNA ile birlikte komplekse katılır. IF-2, özellikle öncül tRNA ile etkileşim halindedir. tRNA, mRNA'nın başlangıç kodonuna bağlanır, böylece IF1 ve IF3 serbest kalır. Daha sonra A 50S ribozomal alt biriminin kompleksle birleşmesi, GTP'ye bağlı IF2 hidrolizini tetikler ve IF2 başlangıç kompleksi oluşumu kompleksten ayrılarak serbest kalır. Sonuç olarak bir 70S (mRNA ve



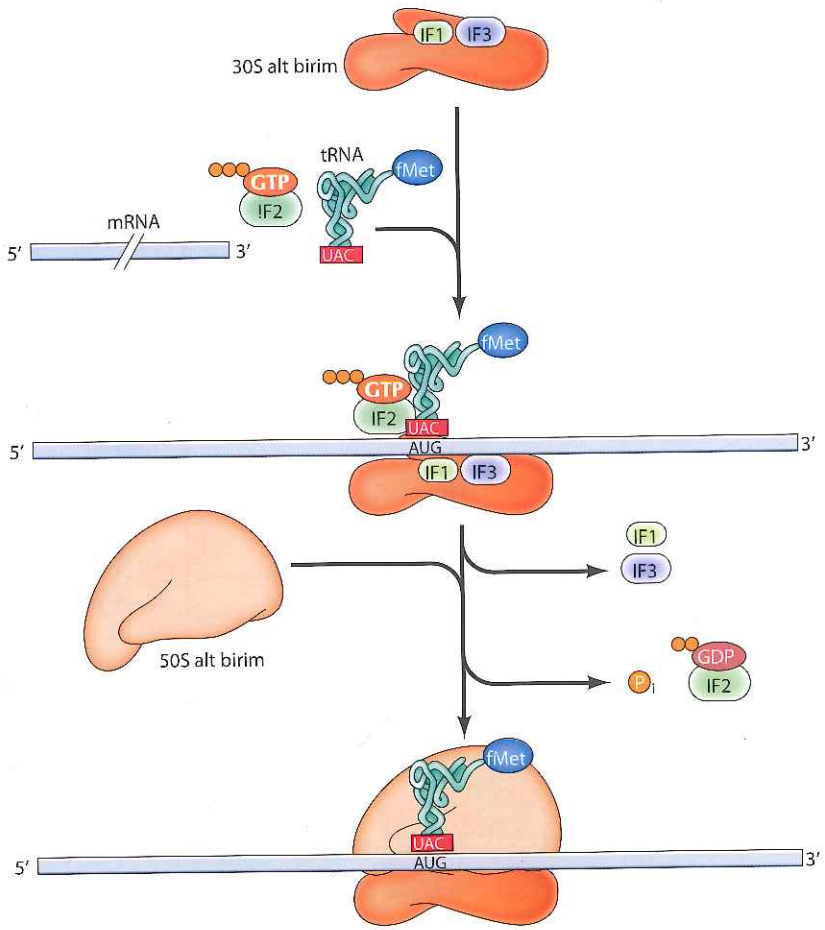
Şekil 9.9 Translasyona genel bakış

Tablo 9.1 Translasyon Faktörleri

Rol	Prokaryotlar	Ökaryotlar
Başlangıç	IF1, IF2, IF3	eIF1, eIF1A, eIF2, eIF2B, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G, eIF4H, eIF5, eIF5B
Uzama	EF-Tu, EF-Ts, EF-G	eEF1α, eEF1$\beta\gamma$, eEF2
Sonlanma	RF1, RF2, RF3	eRF1, eRF3

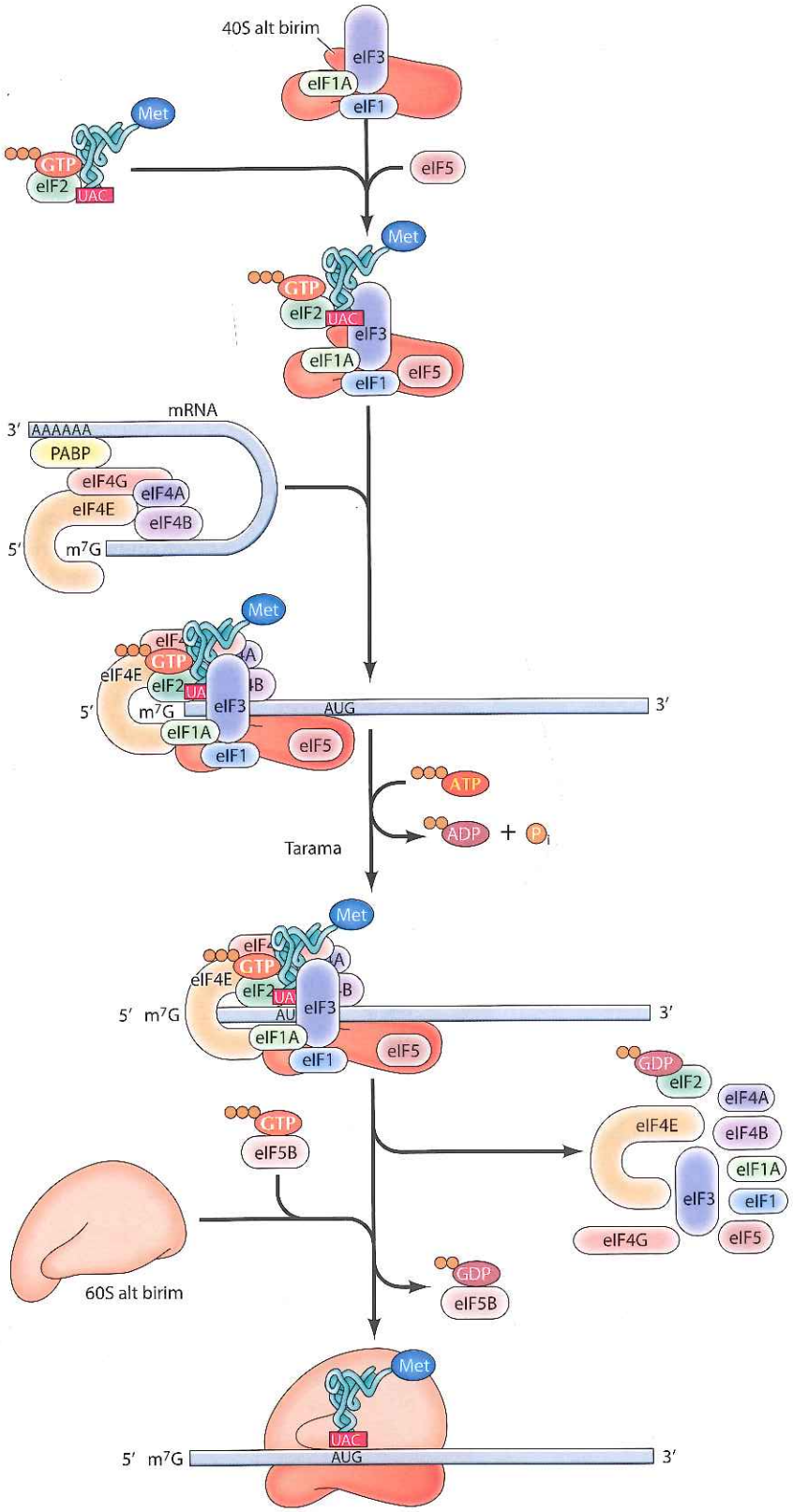
başlatıcı tRNA) hazırdır. Bu kompleks translasyonun uzama evresinde peptid bağı oluşumunu başlatır.

Ökaryotlardaki başlangıç aşaması çok daha karmaşıktır ve ökaryotlar eIF'ler (ökaryot başlangıç faktörleri; bkz. Tablo 9.1) olarak belirtilen en az 12 proteine (her biri çoklu polipeptid zincirinden oluşur) gereksinim duyarlar. eIF1, eIF1A ve eIF-3 faktörleri 40S ribozomal alt birime bağlanır ve eIF2



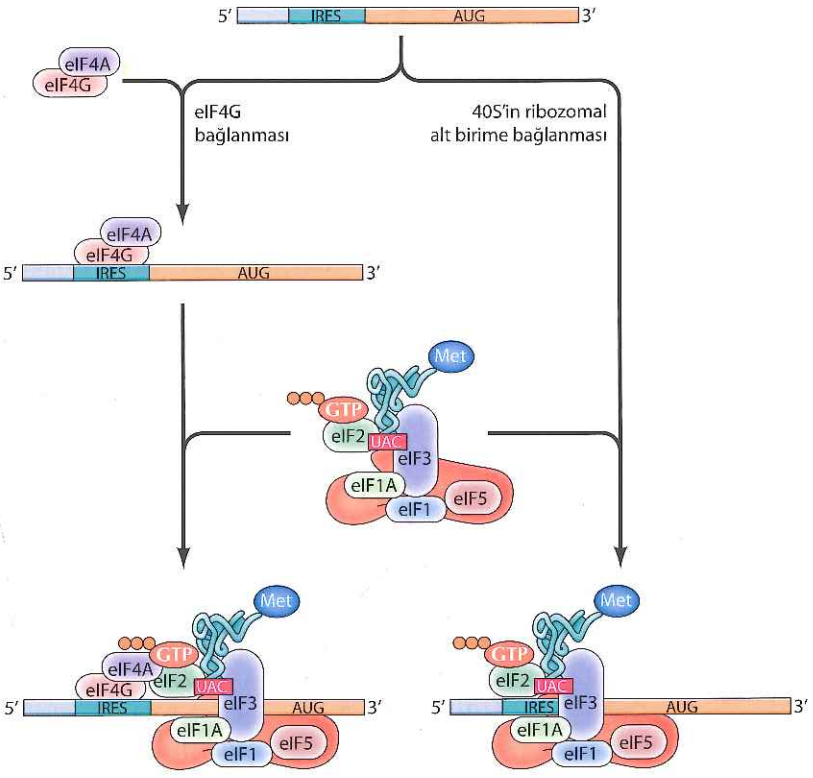
Şekil 9.10 Bakterilerde translasyonun başlaması Başlama faktörleri IF1 ve IF3 başlangıçta 30S ribozomal alt birime bağlıdır. Daha sonra bu komplekse mRNA, başlatıcı *N*-formilmetionil (fmet) tRNA ve IF2 (GTP bağlı) katılır. Bunun sonrasında IF1 ve IF3 ayrılır ve 50S alt birim komplekse katılarak bağlı GTP'nin hidrolizini tetikler ve GDP-bağlı IF2 ayrılır.

Şekil 9.11 Ökaryotik hücrelerde translasyonun başlaması Başlama faktörleri eIF1, eIF1A ve eIF3 40S ribozomal alt birime bağlanır. Başlatıcı metionil tRNA eIF2'ye (GTP ile kompleks) bağlıdır ve 40S alt birimle kompleks oluşturur. mRNA eIF4E (5′Cap bölgesine bağlı), eIF4G (5′Cap bölgesindeki eIF4E ve 3′poli A kuyruğundaki PABP ile bağlı), eIF4A ve eIF4B tarafından 40S alt birime getirilir. Ribozom daha sonra ilk başlama kodonu AUG'yi bulmak üzere mRNA'yı tarar. Tarama enerji ister ve buna ATP hidrolizi eşlik eder. Başlama kodonu AUG tanındığı zaman eIF5 eIF2'ye bağlı GTP hidrolizini tetikler bunu eIF2 (GDP ile kompleks) ve diğer başlangıç faktörlerinin serbest kalması takip eder. Daha sonra 60S ribozomal alt birim eIF5B'nin aracılığı ile 40S kompleksine katılır.

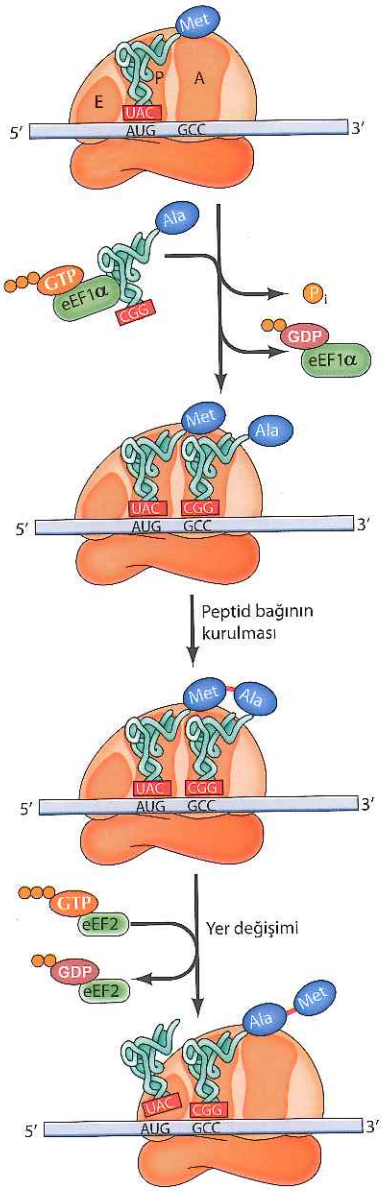


(GTP ile kompleks halinde) başlatıcı metionil tRNA ile ilişki kurar (Şekil 9.11). 40S alt biriminin öncül tRNA ile birleşmesi ile başama öncesi kompleks oluşur. Mesajcı RNA eIF4 grubu tarafından tanınır ve ribozoma götürülür. mRNA'nın 5′ kep kısmı ise, eIF4E tarafından tanınır. Diğer bir faktör eIF4G, hem mRNA'nın 3′ ucundaki poli A kuyruğuna bağlı olan bir proteine (poli A bağlanan protein veya PABP) hem de eIF4E'ye bağlanır. Böylece ökaryot başlama faktörleri RNA'nın 3′ ve 5′ olmak üzere her iki ucunu da tanıyarak, poliadenilasyonun translasyona olan uyarıcı rolünü gündeme getirir. Başlama faktörleri eIF4E ve eIF4G ile eIF4A ve eIF4B etkileşir ve daha sonra eIF4G'nin eIF3 ile etkileşimi ile mRNA'yı 40S ribozomal alt birimine getirir. 40S ribozomal alt birim üzerine bağlı olan metionil tRNA eIF'ler ile birlikte AUG başlama kodonunu belirlemek üzere mRNA'yı tarar. AUG kodonuna ulaşıldığı zaman, eIF5 eIF2'ye bağlı olan GTP'nin hidrolizini tetikler. Bunun üzerinebaşlama faktörleri ayrılırlar (GDP'ye bağlı eIF2 ile bağlantılı olarak) ve 60S alt birim 40S alt birime bağlanarak ökaryot hücrelerin 80S başlama kompleksini oluştururlar.

Bu bölümde daha önce belirtildiği gibi, bazı viral ve ökaryotik mRNA' lar iç kısımlarında translasyonun 5′ kep bölgesinden bağımsız olarak başlayabileceği ribozoma giriş bölgesi (*IRES*) içeririler. Viral mRNA'larda bu ya IRES dizilerinin doğrudan eIF4G'ye bağlanmasıyla ya da eIF4A veya 40S ribozomal alt birimle kompleks oluşturarak bağlanması ile düzenlenir (Şekil 9.12). IRES'in hücresel mRNA' lardaki etki mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır, ancak eIF4G–eIF4A kompleksine bağlanması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.



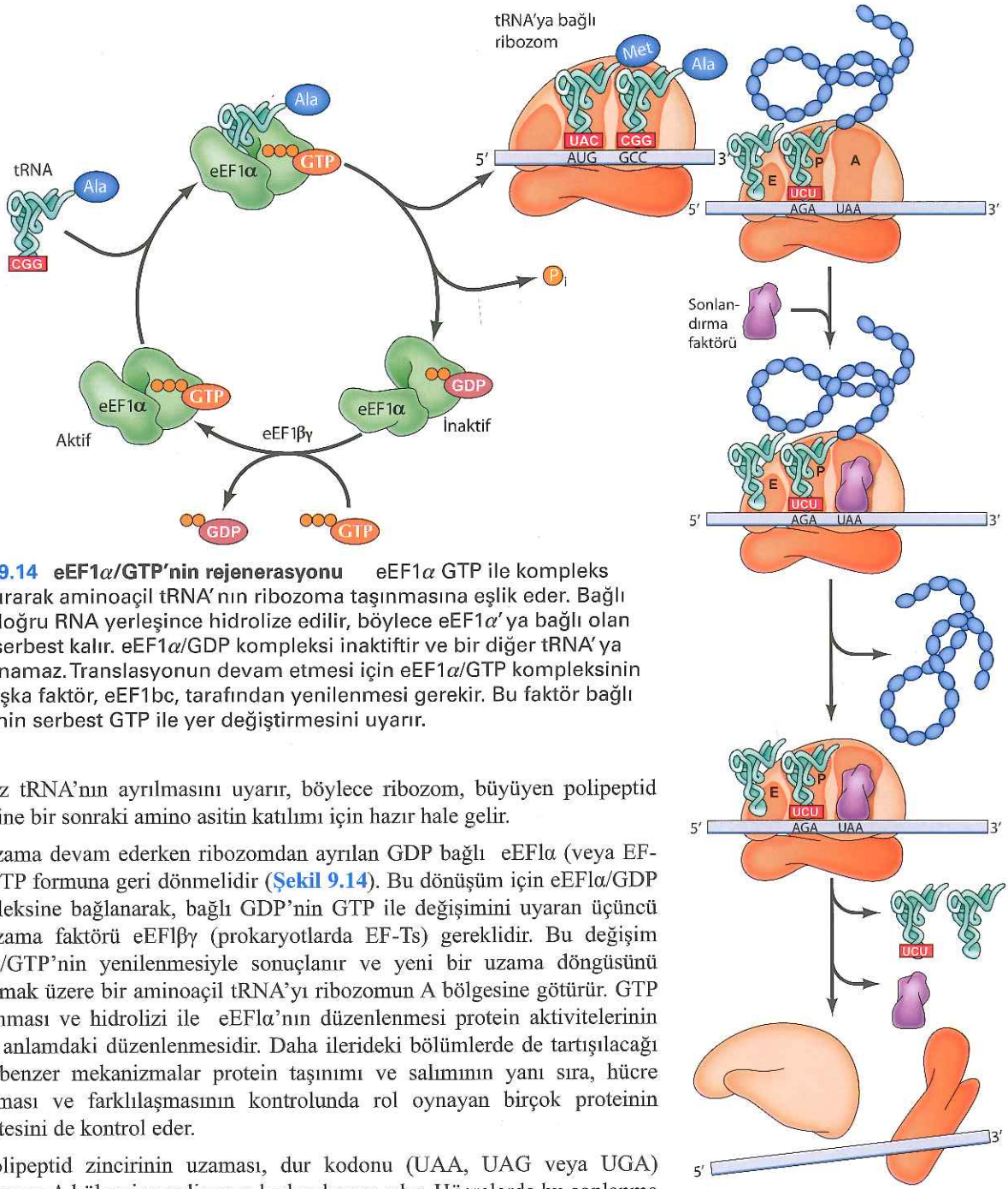
Şekil 9.12 Translasyonun internal ribozom giriş bölgesinde başlaması Bazı mRNA'larda Internal Ribozom Giriş Bölgesi (IRES) eIF4A ve eIF4G kompleksi tarafından tanınabilir, bu aşamayı eIF2'ye bağlı başlatıcı metionil tRNA ile kompleks oluşturmuş 40S ribozomal alt birimin getirilmesi takip eder. Alternatif olarak diğer bazı mRNA'larda IRES doğrudan 40S ribozomal alt birim tarafından tanınır.



Şekil 9.13 Translasyonun uzaman evresi Ribozomlar P (Peptidil), A (Aminoaçil) ve E (çıkış) olarak adlandırılan üç tRNA bağlanma bölgesine sahiptir. Başlatıcı metionil tRNA A bölgesini boş bırakarak P bölgesine yerleşir. Daha sonra ikinci amino asit (yani alanin tRNA'sı) eEF1α (GTP ile kompleks oluşturmuş) tarafından A bölgesine getirilir. GTP hidrolizini takiben alanin tRNA'sını A bölgesine yerleştirmiş olan eEF1α (GTP ile kompleks oluşturmuş) ribozomu terk eder. Daha sonra peptid bağı kurulur metionin A bölgesindeki amino açil tRNA' ya transfer olur. Bunu takiben ribozom mRNA üzerinde üç nükleotid hareket eder. Bu hareket bir sonraki amino asidin ilavesine hazır boş A bölgesi bırakacak şekilde peptidil tRNA (Met-Ala) P bölgesine ve yüksüz tRNA' yı da E bölgesine transfer eder. Translokasyon GTP hidrolizi ile birlikte eEF2 aracılığı ile olur. Ökaryotik hücreler için resimde gösterilen süreç prokaryotlardakine çok benzer (Tablo 9.1 de prokaryot uzama faktörlerinin isimleri verilmiştir).

Başlama kompleksi oluştuktan sonra, translasyon polipeptid zincirinin uzaması ile devam eder. Uzamanın mekanizması prokaryot ve ökaryot hücrelerin her ikisinde benzerdir (**Şekil 9.13**). Ribozomda 3 tRNA bağlama bölgesi bulunur, P (peptidil), A (aminoaçil) ve E (çıkış: exit) ile gösterilen çıkış bölgeleri. Başlatıcı metionil tRNA P bölgesine bağlanır. Uzama aşamasında ilk adım, bir sonraki tRNA'nın mRNA'daki ikinci kodonla eşleşerek, A bölgesine bağlanmasıdır. Aminoaçil tRNA, GTP ile bağlanmış bir **uzama faktörü** (prokaryotlarda EF-Tu, ökaryotlarda eEFlα) tarafından ribozoma getirilir. Uzamakta olan polipeptid zincirine katılmak üzere doğru aminoaçil tRNA'nın seçilmesi, protein sentezinin doğruluğunu belirleyen kritik bir aşamadır. Her ne kadar bu seçim, mRNA'daki kodon ve tRNA'daki antikodon arasındaki baz eşleşmesine dayansa da, baz eşleşmesi tek başına protein sentezinin 10^{-3}'den daha az olan hata oranı ile doğruluğunu sağlamada yeterli değildir. Bu doğruluk, küçük ribozomal alt birimdeki, doğru kodon-antikodon baz eşleşmesini tanıyan ve yanlış eşleşmeleri ayıran 'deşifre merkezi' tarafından sağlanır. Doğru aminoaçil tRNA'nın A bölgesine yerleşmesi eEFlα'ya bağlı olan GTP'nin hidrolizini ve GDP-bağlı uzama faktörünün ayrılmasını uyaran bir konformasyonal değişikliği tetikler. Ribozomlarla ilgili son yapısal çalışmaların dikkate değer bir sonucu da, peptidil transferaz aktivitesi gibi, deşifre merkezinde doğru kodon-antikodon eşleşmesinin algılanmasının proteinlere değil, esas olarak ribozomal RNA'nın aktivitesine dayanıyor olmasıdır.

eEFlα ribozomu terk ettiği zaman, P bölgesindeki başlatıcı metionil tRNA ve A bölgesindeki ikinci aminoaçil tRNA arasında peptid bağı oluşabilmektedir. Bu reaksiyon ribozomal RNA'nın kritik rolüyle (daha önce tartışıldığı gibi), büyük ribozomal alt birim tarafından katalizlenir. Sonuç, metioninin ribozomun A bölgesindeki aminoaçil tRNA'ya transferi ile bu pozisyonda peptidil tRNA oluşması ve P bölgesindeki başlatıcı tRNA'nın yüksüz kalmasıdır. Uzamadaki ikinci adım, diğer bir uzama faktörünü gerektiren (prokaryotta EF-G, ökaryotta eEF2) ve yeni bir GTP hidrolizi ile birlikte ilerleyen translokasyondur. Translokasyon sırasında ribozom, bir sonraki kodon boş A bölgesine gelecek şekilde, mRNA üzerinde üç nükleotid kayar. Bu aşama peptidil tRNA'yı A bölgesinden P bölgesine, yüksüz tRNA'yı da P bölgesinden E bölgesine aktarır. Böylece ribozom, A bölgesi boş ve P bölgesinde peptidil tRNA bağlı olarak kalır. A bölgesine yeni bir aminoaçil tRNA'nın bağlanması E bölgesindeki



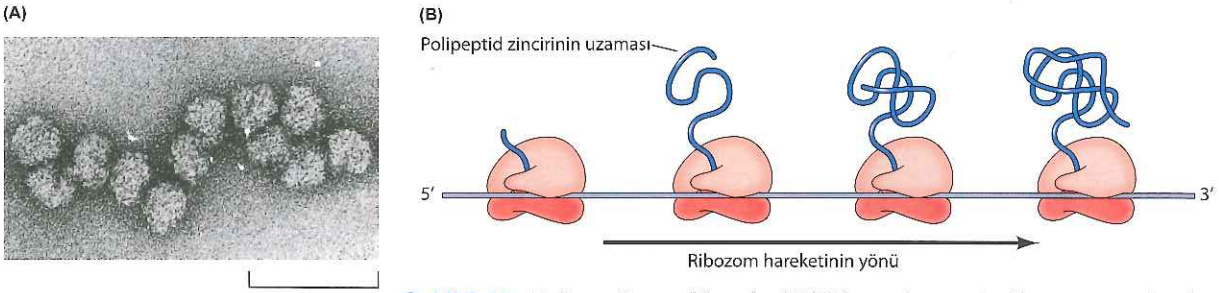
Şekil 9.14 eEF1α/GTP'nin rejenerasyonu eEF1α GTP ile kompleks oluşturarak aminoaçil tRNA'nın ribozoma taşınmasına eşlik eder. Bağlı GTP doğru RNA yerleşince hidrolize edilir, böylece eEF1α'ya bağlı olan GDP serbest kalır. eEF1α/GDP kompleksi inaktiftir ve bir diğer tRNA'ya bağlanamaz. Translasyonun devam etmesi için eEF1α/GTP kompleksinin bir başka faktör, eEF1bc, tarafından yenilenmesi gerekir. Bu faktör bağlı GDP'nin serbest GTP ile yer değiştirmesini uyarır.

yüksüz tRNA'nın ayrılmasını uyarır, böylece ribozom, büyüyen polipeptid zincirine bir sonraki amino asitin katılımı için hazır hale gelir.

Uzama devam ederken ribozomdan ayrılan GDP bağlı eEFlα (veya EF-Tu) GTP formuna geri dönmelidir (Şekil 9.14). Bu dönüşüm için eEFlα/GDP kompleksine bağlanarak, bağlı GDP'nin GTP ile değişimini uyaran üçüncü bir uzama faktörü eEFlβγ (prokaryotlarda EF-Ts) gereklidir. Bu değişim eEFlα/GTP'nin yenilenmesiyle sonuçlanır ve yeni bir uzama döngüsünü başlatmak üzere bir aminoaçil tRNA'yı ribozomun A bölgesine götürür. GTP bağlanması ve hidrolizi ile eEFlα'nın düzenlenmesi protein aktivitelerinin genel anlamdaki düzenlenmesidir. Daha ilerideki bölümlerde de tartışılacağı gibi, benzer mekanizmalar protein taşınımı ve salımının yanı sıra, hücre çoğalması ve farklılaşmasının kontrolunda rol oynayan birçok proteinin aktivitesini de kontrol eder.

Polipeptid zincirinin uzaması, dur kodonu (UAA, UAG veya UGA) ribozomun A bölgesine gelinceye kadar devam eder. Hücrelerde bu sonlanma sinyallerine karşı gelen antikodona sahip tRNA'lar bulunmaz, bunun yerine sinyalleri tanıyan **sonlandırma faktörleri** bulunur ve protein sentezini sonlandırırlar (Şekil 9.15). Prokaryot hücrelerde bitiş kodonlarını tanıyan iki

Şekil 9.15 Translasyonun sonlanması A bölgesindeki dur kodonu (örn., UAA) tRNA yerine sonlandırma faktörü tarafından tanınır. Sonuçta, tamamlanmış polipeptid ve onun ardından da mRNA ve tRNA ribozomdan ayrılır.



Şekil 9.16 Polizomlar Mesajcı RNA'lar çok sayıda ribozom tarafından (polizom) seri halinde proteine çevrilirler. (A) Ökaryot polizomların elektron mikroskop fotoğrafı, (B) Genel polizomların şematik görünümü. 3′ ucuna yakın ribozomlar üzerinde daha uzun polipeptidler olduğuna dikkat ediniz. (A, M. Boublik et al., 1990 *The Ribosome*, p. 117 den, Amerika Mikrobiyoloji Derneğinin izni ile)

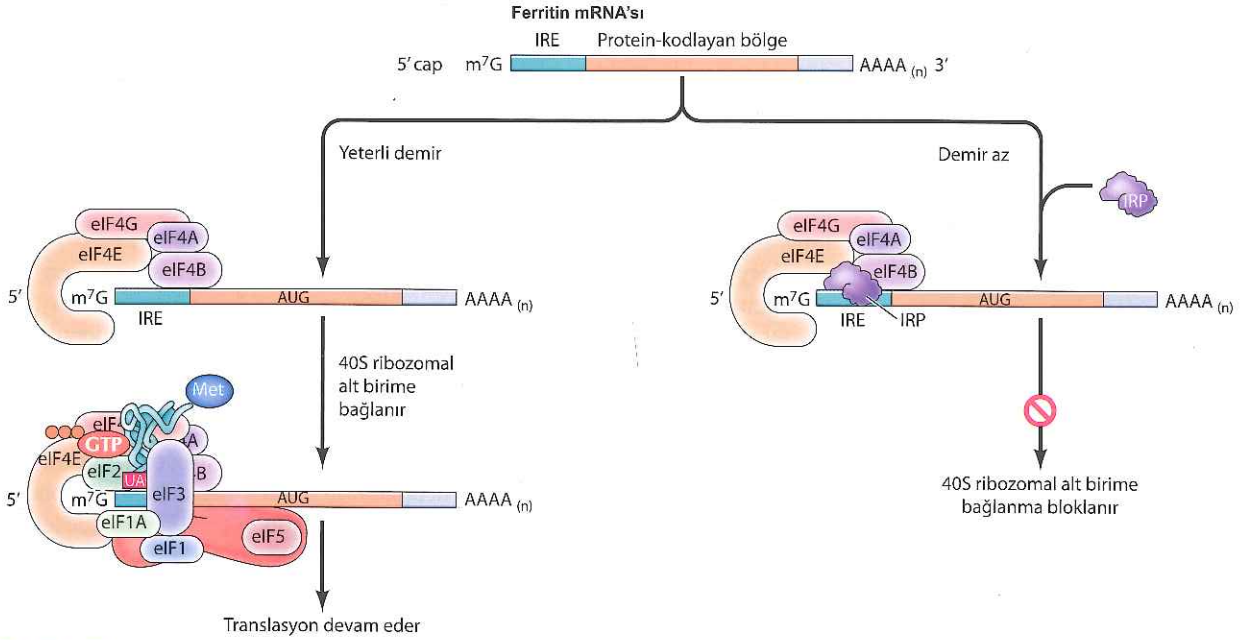
sonlandırma faktörü bulunur; RF-1 UAA veya UAG'yi tanır RF-2 UAA veya UGA'yı tanır (bkz. Tablo 9.1). Ökaryot hücrelerde tek sonlandırma faktörü (eRF1) her üç sonlandırma kodonunu da tanır. Ökaryot ve prokaryot hücrelerin her ikisinde de özgül bitiş kodonlarını tanımayan, ancak RF1 (veya eRF1) ve RF2 ile birlikte iş gören sonlandırma faktörleri bulunur (sırasıyla RF3 ve eRF3). Sonlandırma faktörü A bölgesindeki bitiş kodonuna bağlanır ve tamamlanmış polipeptidin ribozomdan salınmasına neden olan P bölgesindeki polipeptid ve tRNA arasındaki bağın hidrolizini tetikler. Daha sonra tRNA serbest kalır ve ribozomal alt birimlerle mRNA kalıbı birbirinden ayrılırlar.

Prokaryot ve ökaryot hücrelerin her ikisinde de tek bir mRNA molekülü eş zamanlı olarak, çok sayıda ribozom tarafından okunabilir. Bir ribozom başlama bölgesinden uzaklaşır uzaklaşmaz, bir başkası mRNA'ya bağlanır ve yeni bir polipeptid sentezi başlar. Böylece mRNA genellikle aralarında 100 ile 200 nükleotid aralık bulunan ribozom serileri tarafından proteine çevrilirler (Şekil 9.16). mRNA'ya bağlı ribozom grupları, poliribozom veya **polizom** olarak adlandırılırlar. Grup içinde her ribozom, farklı bir polipeptid zincirini sentezinde bağımsız olarak görev yapar.

Translasyonun düzenlenmesi

Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde transkripsiyon ilk aşama olmakla birlikte, gen ifadesi değiştirilmesinde mRNA'nın translasyonunda anahtar rol oynar. Bazı özel mRNA' ların translasyonu hem translasyonu baskılayan proteinler ile, hem de kodlamayan mikro RNA'lar tarafından düzenlenebilmektedir, ki bunlar ökaryot hücrelerin gen ifadesinin düzenlenmesinde başlıca düzenleyiciler olarak kabul edilir. İlave olarak hücrelerin global çevrimsel aktiviteleri hücresel streslere, besin miktarına ve büyüme faktörü uyarılarına cevap olarak da değiştirilebilir.

Baskılayıcı proteinlerin (translasyonu engeller) özgül mRNA dizilerine bağlanması translasyonu düzenleyen mekanizmalardan biridir. Bu mekanizmanın iyi bilinen bir örneği hücrede demir depo eden protein ferritin sentezinin düzenlenmesidir (Şekil 9.17). Ferritin mRNA'sının çevrilmesi demir miktarı tarafından düzenlenir: demir fazla ise ferritin de daha fazla sentezlenir. Bu düzenleme, demir yokluğunda ferritin mRNA sının 5′ proteine çevrilmeyen bölgesindeki dizilere (demir yanıt elemanı: *the iron response element* veya *IRE*) bağlanarak translasyonu engelleyen demir düzenleyici proteinler



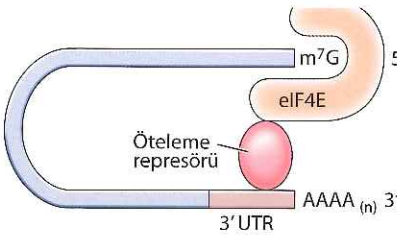
Şekil 9.17 Ferritinin translasyonel düzenlenmesi mRNA'nın 5′ Kep bölgesinin yakınında Demir Yanıt Elemanı: "*Iron Respons Element*" (*IRE*) bulundurur. Yeterli demir varlığında mRNA'nın translasyonu normal ilerler. Eğer demir yetersiz ise Demir Düzenleyici Protein adı verilen (IRP: *iron regulatory protein*) bir protein IRE'e bağlanır, mRNA'nın 40S ribozomal alt birime bağlanmasını engelleyerek translasyonu durdurur.

(IRP'ler: *iron regulatory proteins*) tarafından sağlanır. Demir varlığında demir düzenleyici proteinler demir düzenleyici proteinler IRE dizilerine bağlanamaz ve ferritin translasyonu devam eder. IRE 5′ kep bölgesindeki 40 nükleotid içerisinde yer alır ve öyle görülür ki demir düzenleyici proteinler mRNA'nın 40S ribozomal alt birime bağlanmasını engelleyerek translasyonu baskılar.

Translasyon aynı zamanda bazı mRNA'ların 3′proteine çevrilmeyen bölgelerindeki özgül dizilere bağlanan proteinler tarafından da düzenlenebilmektedir. Bir çok durumda bu translasyonel baskılayıcılar başlatma faktörü eIF4E'ye bağlanarak eIF4E ve eIF4G'nin etkileşmesini bloklar ve translasyonun başlamasını engelleyerek fonksiyon görür (Şekil 9.18). mRNA'nın 3′proteine çevrilmeyen bölgesine bağlanan proteinler ayni zamanda mRNA'ların hücrede belli bölgelere yerleşip, proteinlerin özgül hücre içi bölgelerde üretilmesine imkan verir. Yumurta hücresi, embriyolar, sinir hücreleri ve hareketli fibroblastlar dahil olmak üzere bir çok hücre tipinde mRNA'nın yerleşimi translasyonun düzenlenmesinin önemli bir parçasıdır. Örneğin, mRNA'nın yumurta veya embriyoda özgül bölgeye yerleşmesi,

Bilgi İçin

Nöronlar arasındaki sinapsislerde bazı özgül mRNA'lar yerleşiktir. Buralarda yerleşik mRNA'ların düzenlenmiş çevirimi öğrenme ve hafızada rol oynayabilen sinapsislerin korunabilmesi için gerekli görünmektedir.



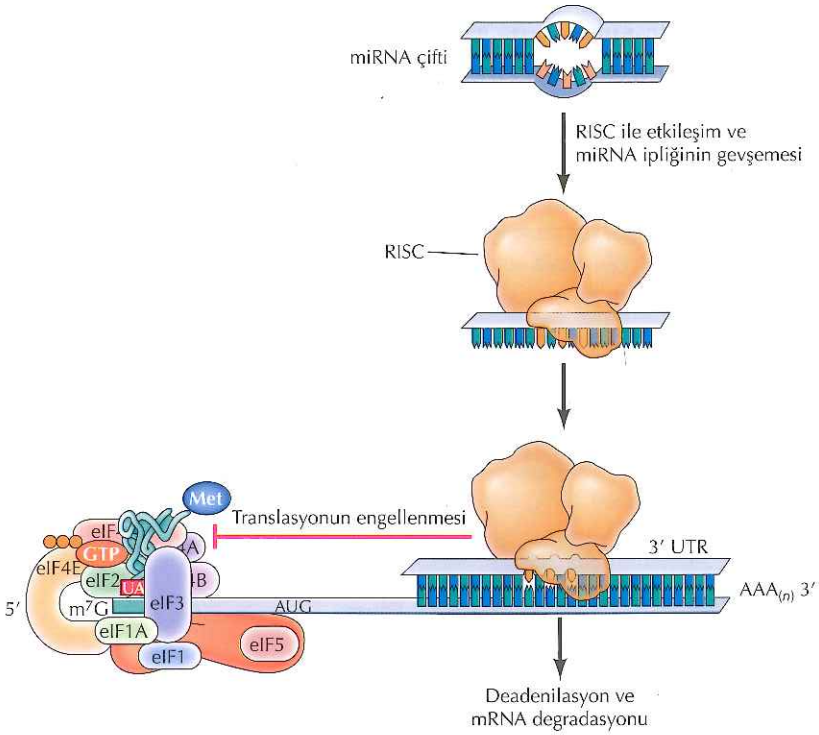
Şekil 9.18 3′ proteine çevrilmeyen dizilere çevrimsel baskılayıcı bağlanması Çevrimsel baskılayıcılar 3′ proteine çevrilmeyen bölgedeki (UTR) düzenleyici dizilere bağlanabilirler ve 5′ kep bölgesine bağlı olan başlatma faktörü eIF4E'e bağlanarak translasyonu engeller. Bu da normal başlama kompleksinin oluşumunu durdurarak çevirimi engeller (bkz. şekil 9.11)

Şekil 9.19 ***Xenopus*** **oositlerinde mRNA'nın yerleşimi** *In situ* hibridizasyonla *Xlerk* mRNA'sının *Xenopus* oositlerinde vejetal kortekste yerleşimi resmedilmiştir. (Boston Üniversitesi' nden James Deshler 'in izni ile.)

gelişen embriyoda proteinlerin doğru yerlerde sentezlenmesine izin vererek gelişimde önemli rol oynar (Şekil 9.19). mRNA'nın yerleşimi translasyonun düzenlenmesi ile birlikte ilerler, böylece mRNA gelişim evresine uygun doğru yerleşime ulaştığında kodladığı proteinler sentezlenir.

Translasyonun düzenlenmesi özellikle erken gelişim sırasında önemlidir. Bölüm 8'de tartışıldığı gibi, oositlerde (döllenmemiş yumurta) çeşitli mRNA'lar proteine çevrilmeyecek şekilde depolanır; bu mRNA'ların translasyonu fertilizasyonda veya gelişimin ileri evrelerinde aktive olur. Bu translasyonel düzenlenmenin bir mekanizması da oosit mRNA'larının kontrollu poliadenilasyonudur. Oositlerde çok sayıda proteine çevrilmeyen kısa poli A kuyruğu bulunan mRNA'lar (30 – 50 nükleotid) depolanır. Bu depolanan mRNA'lar başlangıçta diğer mRNA'lar gibi yaklaşık 200 nükleotidlik uzun poli A kuyruğu ile sentezlenir (Bkz. Şekil 8.45). Bununla birlikte, sonra 3′ proteine çevrilmeyen bölgedeki özgül dizilere bağlanan ve poli A kuyruğunun büyük bir kısmının uzaklaştırılmasına neden olan, translasyonu baskılayan proteinler tarafından tanınırlar. Bu depolanmış mRNA' lar daha sonra poli A kuyrukları birkaç yüz nükleotide uzatılarak, gelişimin uygun evrelerinde tekrar translasyon için iş başına gelirler. Bu da eIF4G ile etkileşerek translasyonu uyaran Poli A ya bağlanan proteinin (PABP) bağlanmasına olanak verir (Bkz. Şekil 9.11).

Önceki bölümlerde bahsedildiği gibi; son yıllarda çok heyecan veren gelişmelerden biri de kodlamayan RNA'ların gen ifadesinin düzenlenmesindeki rolünün aydınlatılmasıdır. 1998 deki keşiflerinden bu yana kısa çift zincirli RNA aracılığı ile **RNA interferens (RNAi)** gen ifadesinin durdurulmasında deneysel araç olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır (Bkz. Şekil 4.38). Buna ek olarak, normalde hücreler tarafından translasyonun düzenlenmesinde önemli bir mekanizmadır. RNA interferensi düzenleyen başlıca iki tip kısa RNA'dan **kısa engelleyici RNA(*siRNA - short interfering* RNA)** ve **mikroRNA (miRNA)** her ikisi de yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundadır. siRNA'lar daha uzun çift zincirli RNA' ların "Dicer" nükleazlar tarafından kesimi ile oluşurlar. Daha uzun çift zincirli siRNA öncülleri hücrelere deneysel olarak verilebilirler veya hücrede çakışan transkriptlerden köken alabilirler. Bunun aksine öncül miRNA'lar, RNA polimeraz II tarafından yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda primer transkript olarak transkribe olurlar, daha sonra "Drosha" ve "Dicer" nükleazlar tarafından kesilerek 22 nükleotidlik çift iplikli RNA'ları oluştururlar (bkz. Şekil 6.8). miRNA veya siRNA, her ikisinin de bir ipliği RNA ile uyarılan susturucu komplekse (*RNA-induced silencing complex-RISC*) katılır ve siRNA veya miRNA RISC kompleksini komplementer mRNA'ya hedefler. siRNA'lar genellikle hedefleri ile kusursuz çift oluşturup hedef mRNA'nın RISC bileşeni tarafından yıkımını uyarırken (bkz şekil 4.38), miRNA'ların büyük bir kısmı hedef mRNA'larının 3′ proteine çevrilmeyen bölgeleri ile yanlış eşleşmiş çift iplikler oluşturur (Şekil 9.20). Bu durumda mRNA'yı miRNA/RISC kompleksi yıkmaz bunun yerine deadenilasyonu uyararak mRNA'yı yıkıma hedefler ve translasyonu baskılar. miRNA tarafından translasyonun baskılanmasının mekanizması henüz anlaşılmamıştır, ancak başlangıç ve uzama aşamaları ile ilintili olabileceği düşünülmektedir. Son bulgular miRNA'nın, mRNA'nın ikincil yapılarının çözülmesini ve başlangıç kodonunun bulunmasını sağlayan IF4A aktivitesini engelleyebileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, miRNA tarafından translasyonun engellenme mekanizmasını ve eş zamanlı olarak mRNA yıkılmasının nasıl uyarıldığının belirlenmesine yönelik daha ileri çalışmalar gereklidir.

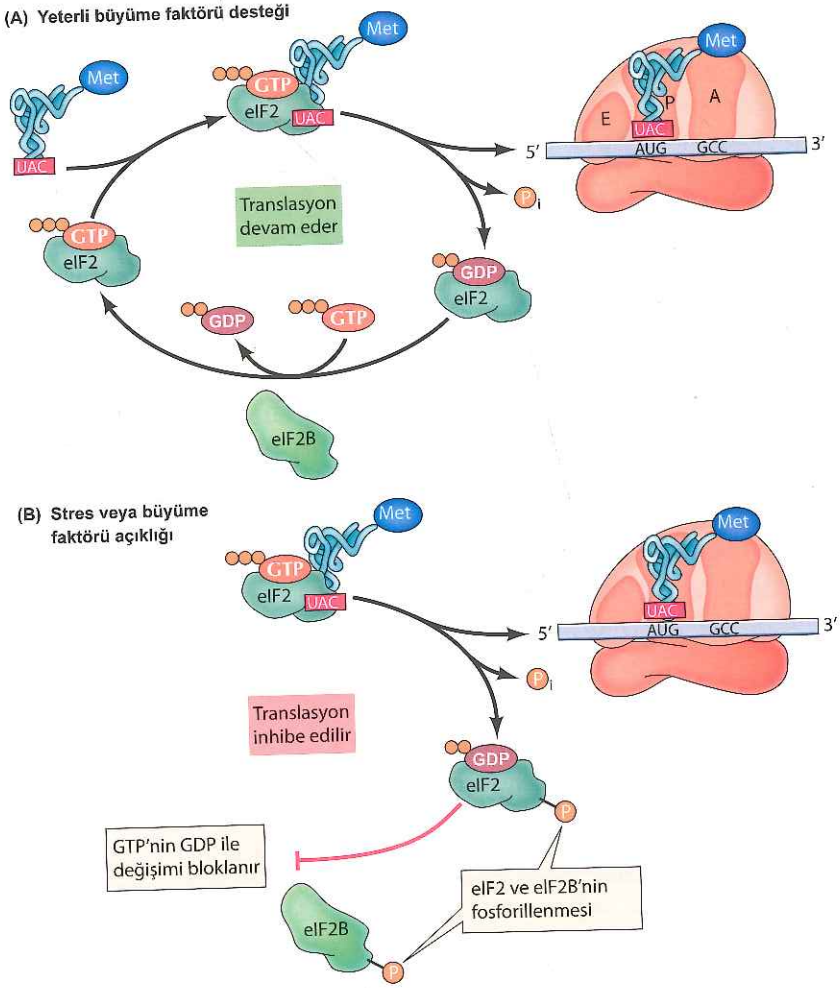


Şekil 9.20 Translasyonun miRNA' lar tarafından düzenlenmesi
miRNA' lar RISC kompleksi ile birleşir. İki miRNA ipliği çözülür ve RISK bir mRNA' nın 3′ protein yansımayan bölgesini (UTR: *untranslated region*) hedefler, böylece translasyonun inhibisyonuna, deadenilasyon ve mRNA yıkımına yol açar. Translasyonun inhibisyonu eIF4A aktivitesi ile interferanstan ve ribozom taramasının engellenmesinin bir sonucu olabilir.

miRNA'ların gen düzenlenmesindeki önemi çok büyüktür. Memeli genomundan kodlanan miRNA sayısının 1000 kadar olduğu tahmin edilmektedir. Yanı sıra her miRNA 100 farklı mRNA'yı hedefleyebilir ve protein kodlayan enlerimizin yarısının miRNA ile düzenlenmeye hedef olduğu tahmin edilmektedir. Biyolojik rolleri yeni keşfedilmekle birlikte, miRNA'lar çeşitli gelişimsel süreçler, hücre çoğalması ve sağ kalım süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oyamaktadır. miRNA'ların aynı zamanda hücre çoğalması ve sağ kalımını da düzenlediği gösterilmiş ve aynı zamanda, miRNA'ların anormal ekspresyonunun kanser ve diğer hastalıkların gelişimine katkısı olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, hem miRNA etki mekanizmasının, hem de biyolojik rollerinin tüm yönleriyle anlaşılması çok aktif araştırma alanlarıdır.

Ökaryotik hücrelerde özgül mRNA'ların translasyonundan çok tüm translasyonel aktiviteleri etkileyen diğer bir translasyonel düzenleme mekanizması, eIF2 ve eIF4E başta olmak üzere başlatma faktörleri aktivitelerinin değişimini kapsar. Daha önce tartışıldığı gibi eIF2 (GTP ile kompleks oluşturur) başlatıcı metionin tRNA'ya bağlanır ve onu ribozoma getirir. Daha sonra eIF2'nin ayrılmasına GTP hidrolizi eşlik eder eIF2 inaktif GDP kompleksi olarak kalır. Diğer bir döngünün başlamasına katılabilmek için

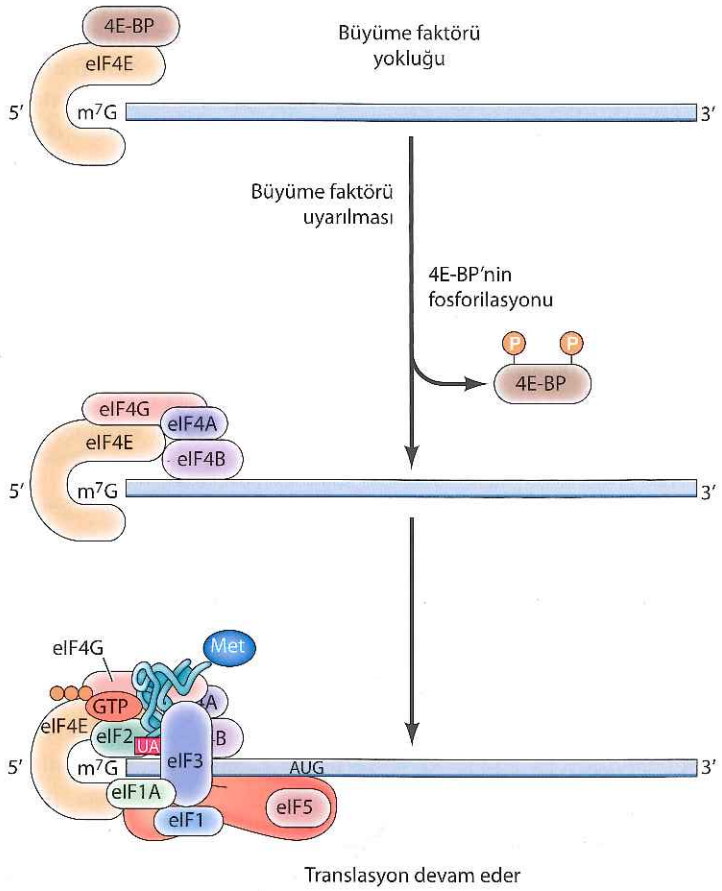
eIF2/GTP kompleksi üzerine bağlı GDP'nin GTP'ya dönüşümü ile rejenere olması gerekir (**Şekil 9.21**). Bu dönüşüm diğer bir faktör olan eIF2B aracılığı ile sağlanır. eIF2 aktivitesinin GTP bağlanması ve hidrolizi ile kontrolü eIF21α'nın kontrolüne benzer (Bkz. Şekil 9.14). Bununla birlikte eIF2'nin düzenlenmesi çeşitli ökaryotik hücrelerde kritik kontrol noktası oluşturur. Özellikle eIF2 ve eIF2B'nin her ikisi de düzenleyici protein kinazlar tarafından fosforlanabilir. Bu fosforilasyonlar bağlı GDP'nin GTP'ye dönüşümünü engelleyerek translasyonun başlamasını engeller. Örneğin memeli hücreleri büyüme faktörü açlığı veya stres ile karşılaşırlar ise protein kinazlar eIF2 ve eIF2B'yi fosforlayarak protein sentezinin ilerlemesini engeller.



Şekil 9.21 eIF2 ve eIF2B' nin fosforilasyonu ile translasyonun düzenlenmesi (A) eIF2'nin (GTP ile kompleks oluşturmuş) aktif formu başlatıcı metionil tRNA'yı ribozoma yönlendirir (Bkz. şekil 9.11). eIF2 daha sonra inaktif GDP-bağlı formda ribozomdan ayrılır. Translasyonun devam etmesi için, eIF2'nin eIF2B tarafından bağlı GDP'nin GTP'ye değişimini uyararak tekrar aktive edilmesi gerekir. (B) Çevirim eIF2 veya eIF2B fosforile eden kinazlar tarafından da inhibe edilebilir (örneğin eğer hücre stres altında ise veya büyüme faktörleri açlığı halinde). Bu fosforilasyon GTP'nin GDP'ye dönüşümünü engeller böylece eIF2/GTP rejenere edilemez.

Büyüme faktörlerinin rol oynadığı protein sentezi kontrolunda mRNA'nın 5'kep bölgesine bağlanan eIF4E aktivitesinin düzenlenmesi diğer bir kritik noktadır (**Şekil 9.22**). Örneğin memeli hücrelerinde protein sentezini uyaran büyüme faktörleri eIF4E'ye bağlanan düzenleyici proteinleri (eIF4E'ye bağlanan proteinler veya 4E-BP adı verilen) fosforile eden protein kinazları aktive ederler. Uygun büyüme faktörlerinin yokluğunda, fosforlanmamış 4E-BP'ler eIF4E'ye bağlanırlar ve eIF4E ile eIF4G arasındaki etkileşimleri bozarak translasyonu inhibe ederler. Yeterli miktarda büyüme faktörlerinin bulunması halinde 4E-BP'lerin fosforilasyonu bunların eIF4E ile etkileşimini engeller ve bu da translasyonun başlama hızının artışına neden olur.

Translasyonun tamamen baskılanması, aslında bazı mRNA'ların seçici olarak translasyonunu uyardığı da dikkate değer bir konudur. Örneğin, iç kısmında ribozom giriş bölgesi bulunduran mRNA'lar, eIF4E'nin baskılandığı ve bu nedenle kep bağımlı başlangıcın engellendiği durumlarda seçici olarak çevirilirler (bkz şekil 9.12). Böyle bir grup mRNA'nın seçici olarak çevrilmesi hücrelerin açlık, büyüme faktörü yokluğu veya DNA hasarı gibi durumlarla başa çıkmasına yardımcı olur.



Şekil 9.22 eIF4E'nin düzenlenmesi Büyüme faktörleri yokluğunda çevirim eIF4E'ye bağlanan ve onun IF4G ile etkileşimini engelleyen proteinler (4E-BPs) tarafından engellenir. Büyüme faktörleri uyarısı 4E-BP'lerin fosforilasyonuna yol açar, daha sonra translasyonun ilerlemesine izin verecek şekilde eIF4E ayrılır.

Protein Katlanması ve İşlenmesi

Proteine translasyon ile hücrede genetik bilgi akışı tamamlanır. Böylece, DNA'daki nükleotid dizisi polipeptid zincirinde amino asit dizisine çevrilmiş olur. Ancak, polipeptidin sentezi fonksiyonel proteinin üretimine eşdeğer değildir. Kullanılır hale gelmesi için, polipeptidin üç boyutlu konformasyonuna katlanması ve birçok durumda da, fonksiyonel kompleksi oluşturmak üzere polipeptid zincirlerinin bir araya gelmeleri gerekir. Ek olarak birçok protein hücre içinde doğru yerleşim ve fonksiyonları için kritik olan kesim, karbohidratların ve lipidlerin kovalent bağlanması da dahil olmak üzere daha ileri değişimlere gitmektedir.

Video 9.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v9.2
Protein Katlanma Simülasyonu Protein katlanmasının karmaşıklığını gösteren, sürecin anlaşılmasına önemli katkılar sağlayan bilgisayar simülasyonu.

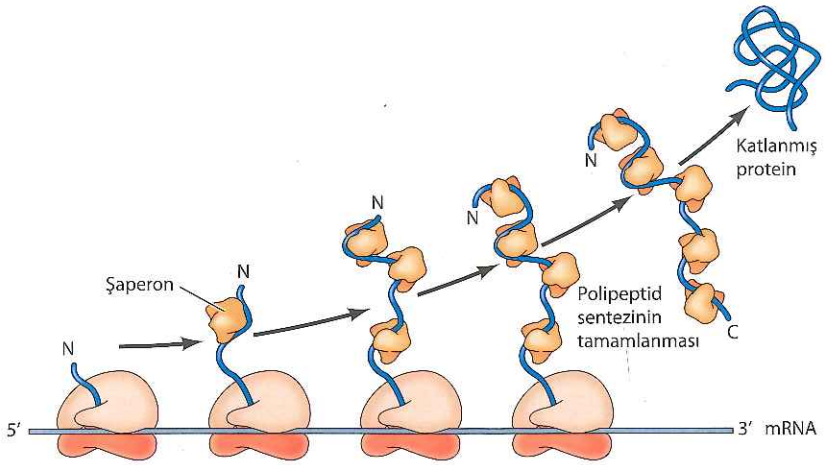
Şaperonlar ve protein katlanması

Bölüm 2'de gözden geçirildiği gibi proteinlerin üç boyutlu konformasyonları onları oluşturan amino asitlerin yan grupları arasındaki etkileşimin sonucudur. Protein katlanmasının klasik prensibi, bir proteinin doğru üç boyutlu yapıya ulaşması için gerekli tüm bilginin amino asit dizisi tarafından sağlandığıdır. Bu fikir, Christian Anfinsen'in *in vitro* ortamda denatüre RNaz'ın kendiliğinden aktif konformasyonunu aldığını gösterdiği deneyleri ile başlayıp yerleşmiştir (bkz. Şekil 2.17). Bu yüzden protein katlanması ek hücresel faktörlerin gerekmediği, kendi kendine yapılanma süreci gibi görülmekte idi. Bununla birlikte daha yeni çalışmalar bunun hücre içindeki protein katlanması için yeterli bir tanım olmadığını göstermiştir. Proteinlerin hücre içindeki doğru katlanması başka proteinlerin aktiviteleri aracılığı ile sağlanmaktadır.

Diğer proteinlerin katlanmasını kolaylaştıran proteinler moleküler **şaperonlar** olarak adlandırılırlar. Bu terim ilk kez Ron Laskey tarafından, DNA ve histonların nükleozomu oluşturması için gerekli olan bir protein (nükleoplazmin) için kullanılmıştır. Nükleoplazminler histonlara bağlanır ve nükleozom oluşumuna aracılık eder, ancak kendisi nükleozomun son yapısına katılmaz. O halde şaperonlar, oluşan kompleksin bir parçası olmadan katalist gibi davranırlar ve bir araya gelmeyi kolaylaştırırlar. Daha sonraki çalışmalar bu kavramı birçok diğer yapılanma sürecine, özellikle protein katlanmasına aracılık eden proteinleri içerecek şekilde genişlemesini sağlamıştır..

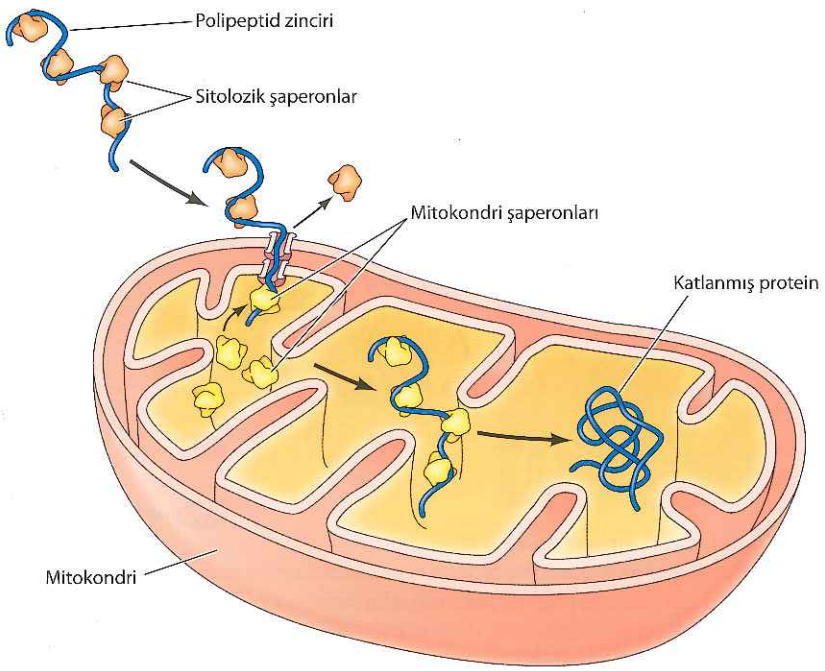
Şaperonların, polipeptidlerin doğru üç boyutlu yapıya katlanması için gerekli olan ek bilgileri taşımadığını ve proteinlerin katlanmış konformasyonlarının sadece onun amino asit dizini tarafından tanımlandığını belirtmek önemlidir. Şaperonlar protein katlanmasını daha çok kendiliğinden yapılanma sürecinde yardımcı olarak katalizlerler. Şaperonların fonksiyonunun, en son doğru katlanmaya giden yoldaki ara ürünler olan katlanmamış veya kısmen katlanmış polipeptidlere bağlanarak onların kararlılıklarını sağlamak olduğu düşünülmektedir.. Şaperonların yokluğunda, katlanmamış veya kısmen katlanmış polipeptid hücre içinde kararsız halde kalabilirler. Şaperonların bağlanması bu katlanmamış polipeptidleri stabilize eder, böylece, hatalı katlanmayı veya kümelenmeyi engelleyerek polipeptidlerin doğru konformasyona katlanmasına olanak sağlarlar.

Şaperonların, ribozom üzerinde sentezlenmekte olan yeni polipeptid zincirine bağlanarak hatalı katlanmayı ya da sentez bitmeden polipeptidin amino ucunun kümelenmesini önlemesi güzel bir örnek oluşturur (**Şekil 9.23**). Proteinler, 100 ile 300 amino asitlik bölümler halinde katlanırlar. Bu durum sentezlenmekte olan zincirin tüm bölgeleri tamamlanıncaya kadar, yeni



Şekil 9.23 Translasyon sırasında şaperonların rolü Şaperonlar sentezlenmekte olan polipeptid zincirinin N-ucuna bağlanır ve polipeptid sentezi tamamlanıncaya kadar, katlanmamış zinciri stabilize eder. Tamamlanmış protein daha sonra ribozomdan ayrılır ve üç-boyutlu doğru konformasyonuna katlanabilir.

zincirin hatalı katlanmadan veya diğer proteinler ile kümelenmeden korunması ve proteinin doğru konformasyona katlanabilmesi için gereklidir. Şaperon bağlanması, katlanmamış konformasyondaki amino terminalini polipeptidin geri kalan kısmı sentezlenip proteinin doğru katlanması tamamlanıncaya kadar stabilize eder. Şaperonlar aynı zamanda katlanmamış polipeptid zincirlerinin organellere taşınması sırasında da –örneğin proteinlerin sitozolden mitokondriye taşınmasında olduğu gibi, kararlı halde tutarlar (**Şekil 9.24**). Proteinler mitokondri zarlarından, sitozolde şaperonlar tarafından korunmuş olarak ve tümüyle katlanmamış bir şekilde geçerler. Mitokonri içindeki şaperonlar, polipeptid zincirinin zardan geçip organel içerisinde katlanmasını kolaylaştırırlar. Ayrıca, çoklu polipeptid zincirinden oluşan proteinlerin ve makromoleküler yapıların bir araya gelmesine de katılırlar (nükleoplazmin gibi).

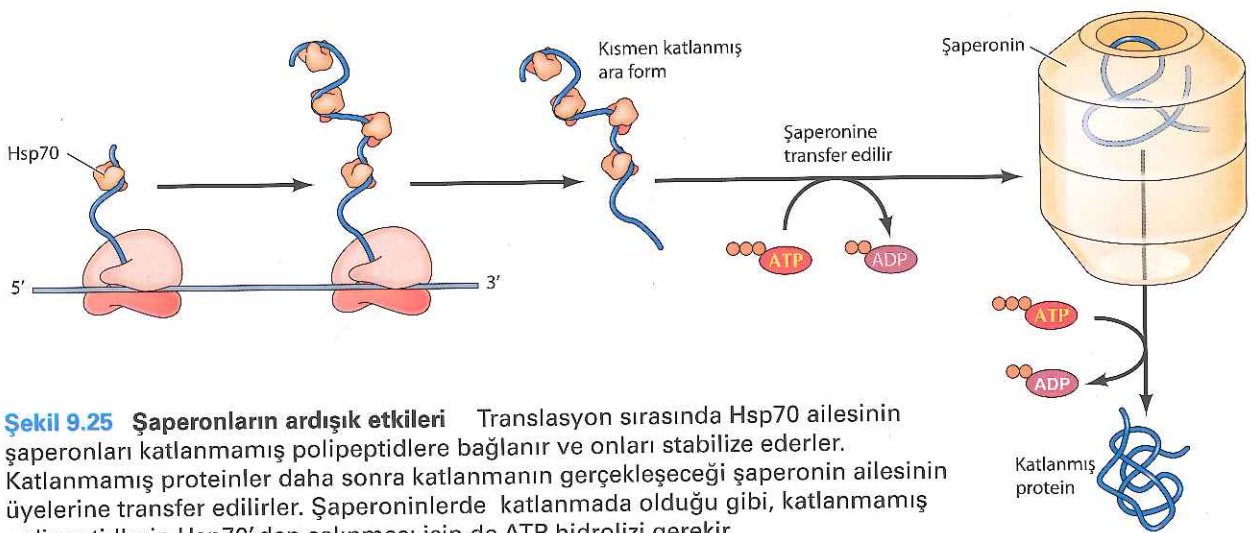


Şekil 9.24 Protein transportu sırasında şaperonların rolü Kısmen katlanmış polipeptid, sitozolden mitokondriye aktarılır. Sitozol şaperonları katlanmamış yapının korunmasını sağlarlar. Mitokondri şaperonları aktarımı ve daha sonra polipeptid zincirinin organel içinde katlanmasını kolaylaştırırlar.

Bugün moleküler şaperon olarak iş gördüğü bilinen proteinlerin çoğu başlangıçta ısı-şok proteinleri (*heat-shock proteins*) olarak tanımlanan hücrelerde, çevresel stres ve yüksek sıcaklıkta eksprese edilen bir protein grubudur. Isı-şok proteinleri (Hsp olarak kısaltılır) yüksek sıcaklıkla karşılaşma sonucunda, kısmen denatüre olan proteinleri korur ve tekrar katlanmasını kolaylaştırır. Şaperon proteinlerinin iki ailesi Hsp70 ve şaperoninler, ökaryot ve bakteri hücrelerinin genelprotein katlanma yolaklarında özellikle önemlidir (**Şekil 9.25**). Her iki ailenin proteinleri polipeptid zincirlerinin katlanmamış bölgelerine bağlanarak iş görür. Hsp70 ve şaperonin ailesi üyeleri bakterilerin ve ökaryotik hücrelerin sitozollerinde ve hücre içi organellerinde (endoplazmik retikulum, mitokondri ve kloroplast) bulunurlar. Hsp70 ailesinin üyeleri polipeptidlerin, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi çeşitli hücresel kompartmanlara taşınmasında olduğu kadar, translasyon sırasında yeni sentezlenen, katlanmamış polipeptid zincirlerini stabilize ederek de görev yapar (örnek için bkz. Şekil 9.23). Bu proteinler, katlanmamış polipeptidlerin kısa hidrofobik bölgelerine (yaklaşık yedi amino asitlik) bağlanarak, onları bu katlanmamış konfigürasyonda tutar ve kümelenmelerini önlerler.

Katlanmamış polipeptid zinciri daha sonra Hsp70 şaperondan doğru protein katlanmasının gerçekleşeceği ve proteinin üç boyutlu fonksiyonel konformasyona ulaşacağı şaperonine transfer edilir. Şaperoninler iki bölmeli yapı oluşturmak üzere üst üste iki halka şeklinde düzenlenmiş çok sayıda protein alt biriminden oluşur. Katlanmamış polipeptid zincirleri şaperon bölmesinin içinde sitozolden korunur. Bu izole ortamda katlanmamış polipeptid zincir bölgelerinin diğer katlanmamış polipeptid zincirleri ile kümeleşmesi engellenerek protein katlanması devam eder.

Bakteri ve ökaryot hücrelerde ilave şaperon aileleri bulunur ve şaperon sayısı ökaryotlarda göreceli olarak daha fazladır. Örneğin, ökaryot hücrelerde bazı proteinlerin katlanması için alternatif yolaklar Hsp70 ve Hsp90 ailesi üyelerinin bir dizi etkileşimini içerir. Hsp90 tarafından katlanma substratları, steroid hormon reseptörleri ve çeşitli protein kinazlar dahil olmak üzere hücre sinyal iletimi ile ilgili proteinlerdir.



Şekil 9.25 Şaperonların ardışık etkileri Translasyon sırasında Hsp70 ailesinin şaperonları katlanmamış polipeptidlere bağlanır ve onları stabilize ederler. Katlanmamış proteinler daha sonra katlanmanın gerçekleşeceği şaperonin ailesinin üyelerine transfer edilirler. Şaperoninlerde katlanmada olduğu gibi, katlanmamış polipeptidlerin Hsp70'den salınması için de ATP hidrolizi gerekir.

Protein katlanma hastalıkları

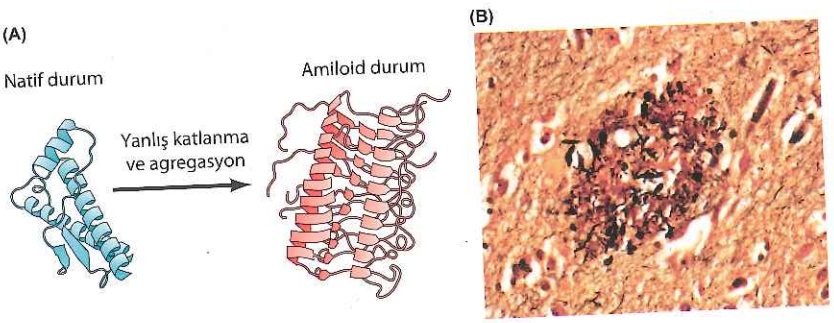
Protein katlanmasındaki hatalar çok sayıda **protein katlanma bozuklukları** olarak bilinen yaygın hastalıklardan sorumludur. Bazı vakalarda protein katlanmasındaki bozukluk, hücre içi fonksiyonel protein düzeyindeki düşme ile sonuçlanan hastalıklara yol açar. Örneğin, kistik fibrozis solunum yolunu kaplayanlar dahil. çeşitli epitel hücrelerin zarını kat eden klor iyonlarının taşınmasından sorumlu CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) olarak adlandırılan proteindeki mutasyonlar neden olur (Bkz. Moleküler Tıp Bölüm 14). Bu mutasyonlar sonucu hatalı klor taşınması solunum yolunun koyu bir mukus ile tıkanıp daralmasına, tekrarlayan enfeksiyonlara ve bir çok hastanın akçiğer hastalığından ölmesine neden olur. Kistik fibrozis vakalarının büyük bir kısmı CFTR'daki kritik bir amino asit (fenilalanin 508) delesyonuna bağlı olarak ortaya çıkar. Bu amino asidin delesyonu CFTR'ın endoplazmik retikulumdaki şaperonlarla etkileşimini bozar, hatalı protein katlanmasına ve etkilenmiş hücrelerin zarında fonksiyonel CFTR düzeyinin azalmasına neden olur.

Tablo 9.2 Protein Kümelenmesi ile İlgili Karakteristik Hastalıklar

Hastalık	Kümelenen Protein
Nörodejeneratif Hastalıklar	
Alzheimer hastalığı	Amiloid-β
Parkinson hastalığı	α-Sinükleinin
Huntington hastalığı	Huntingtin
Amyotrofik lateral skleroz	Süperoksit dismutaz
Süngerimsi ensefalopati	Prion protein
Non-nörodejeneratif Lokalize Hastalıklar	
Tip 2 Diyabet	Amilin
Katarakt	Kristalin
Enjeksiyon-Lokalize Amiloidoz	İnsülin
Sistemik Hastalıklar	
Amiloidl Hafif Zincir Amiloidoz	Immünglobulin hafif zincirleri
Amiliod A Amiloidoz	Serum amiloid A proteini
Senil Sistemik Amiloidoz	Transtiretin

Protein katlanması hatası sonucu fonksiyonel proteinin düşük düzeyde olduğu kistik fibrozisin aksine, Alzheimer, Parkinson ve Tip 2 diyabet gibi birçok hastalık hatalı katlanmış proteinlerin kümeler oluşturması ile ilişkilidir (Tablo 9.2). Bu hastalıkların her birinde, özgül proteinler hatalı katlanarak **amiloid** adı verilen fibröz kümeler oluşturmaktadır. Hatalı katlanmış proteinler bu proteinlerin normal globüler konformasyonlarına karşılık β tabakası yapısı ile karakterize olan çözünmeyen amiloid fibriller şeklinde kümeler oluştururlar

Video 9.3
sites.sinauer.com/cooper7e/v9.3
Alzheimer Hastalığı Mekanizmaları Alzheimer hastalığı nöronal haberleşmeyi engelleyen beta amyloid plaklar ve nörofibriller yumaklar oluşumu ile karakterize bir hastalıktır.



Şekil 9.26 Protein agregasyonu ve amyloid oluşumu (A) Doğal bir globüler protein yanlış katlanır ve amyloid fibriller yaparak β–tabakalı yapıda agregatlar oluşturur. (B) Alzheimer hastalığı olan bir hastanın beynindeki amiloid plak.

Moleküler Tıp

Alzheimer Hastalığı

Hastalık

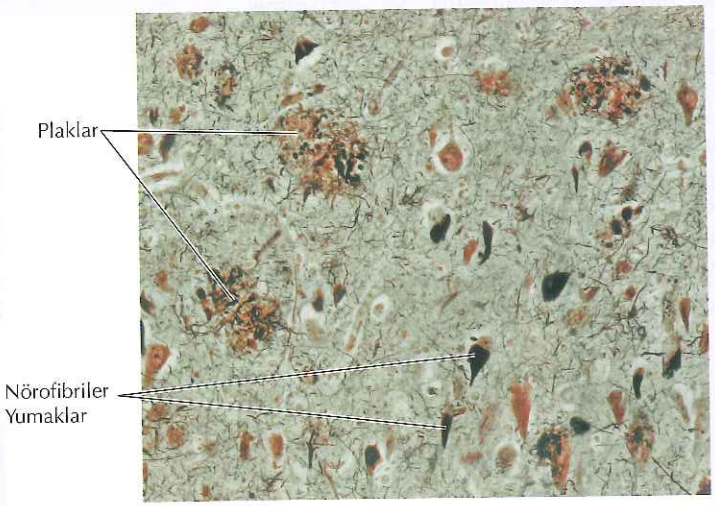
Alzheimer hastalığı 1906'da hafıza kaybı gibi semptomları olan bir mental hastalıktan ölen bir kadının beyin dokusundaki farklı lezyonları tanımlayan Bavyeralı psikiyatrist Dr. Alois Alzheimer tarafından adlandırılmıştır. Bu hastalık demansın, zamanla hafızayı tahrip eden, nedenselleme ve günlük aktiviteleri yerine getirme yeteneklerinin kaybına neden olan ilerlemiş bir formudur. Hastalık sonuçta ölümcüldür ve Alzheimer hastalığının son dönemlerinde olan insanlar yatalak olup, iletişim kuramazlar ve kişisel bakımları için diğer insanlara tamamen bağımlıdırlar. Alzheimer hastalığı 5 milyondan daha fazla Amerikalı'yı etkilemektedir ve Birleşik Devletler'de yılda 500,000'den çok ölüme yol açan, altıncı en sık ölüm nedenidir. Hastalık tanısı genelde 65 yaşın üstündeki kişilere konur ve bu yaş grubundaki insanların yaklaşık %11'inde Alzheimer hastalığı olduğu tahmin edilmektedir.

Moleküler ve Hücresel Temel

Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanan iki lezyon, nörofibriler yumaklar ve amiloid plaklar (bkz. şekil) günümüzde Alzheimer hastalığı için belirteç olarak kullanılıyor. Nörofibriler yumaklar, normalde mikrotübüller ile etkileşimde olan ve tau olarak adlandırılan bir proteinin yanlış katlanmış agregatlarıdır. Amiloid plaklar ise bir transmembran protein olan amiloid öncü proteinin (APP) kesilmiş bir fragmanı olan amiloid β proteininin (Aβ) yanlış katlanmış agregatlarıdır. Aβ'nın hastalıktaki rolü nadir kalıtsal Alzhemer olgularında yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir. Kalıtsal Alzheimer hastalığında hastalık gelişiminden ya APP'deki ya da APP'nin kesiminden sorumlu permeazlardaki yapısal mutasyonlar sonucu Aβ üretiminin artmasına neden olan üç gen sorumludur. Buna ilaveten Aβ'nın rolü transgenik fare modellerindeki çalışmalarda Aβ'nın aşırı ekspresyonunun nörodejenerasyon ve insan hastalığına benzer patolojiler göstermesi ile desteklenmiştir. Ancak Aβ'nın nörodejenerasyona neden olma mekanizması hala tam olarak açıklanamamıştır. Günümüzdeki araştırmalar, amiloid plakların öncülü olan yanılış katlanmış Aβ'nın suda çözünebilir agregatlarının nöronlar için toksik olduğunu ve amiloid plakların kendisinin değil, bu agregatların hastalık gelişiminden sorumlu primer etken olabileceğini göstermiştir.

Önlem ve Tedavi

Günümüzde Alzheimer hastalığının tedavisi veya hastalıktan korunma yöntemi yoktur. Tedaviler hastaların mental fonksiyonlarını sürdürmeye ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmaya yardımcı olmak ile sınırlıdır. Günümüzde Alzheimer tedavisinde nörotransmitterlerin aktivitesini düzenleyen dört ilaç kullanılmaktadır. Bu ilaçlar beyin fonksiyonlarının sürdürülmesine yardımcı olmaktadır, ancak Alzheimer hastalarının yalnızca yarısında etkilidir ve hastalığın ilerlemesini altı ay ile bir yıl geciktirmektedir. Araştırmalar Alzheimer hastalığının patogenezini doğrudan etkileyecek örneğin Aβ üretimini inhibe eden veya Aβ agregatlarının gelişimini engelleyen ilaçlar geliştirmeye odaklanmıştır. Ancak bu gibi ilaçların gerçekleşmesi gelecekteki en önemli hedeflerdendir.

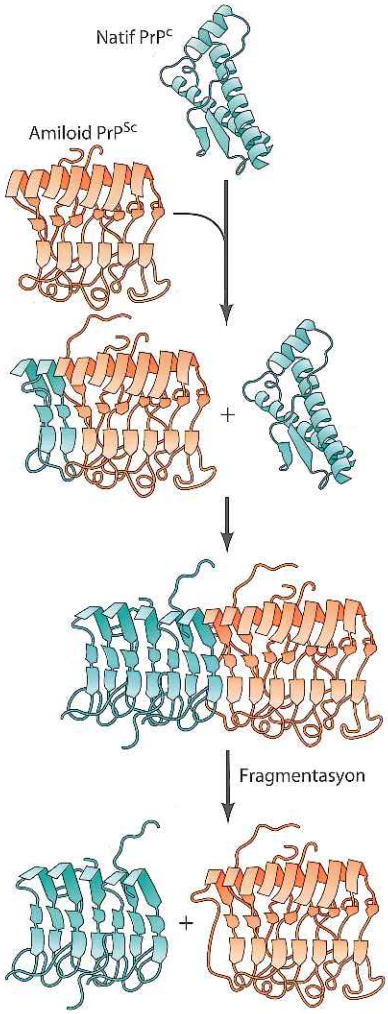


Alzheimer hastalıklı bir kişinin beynindeki amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar

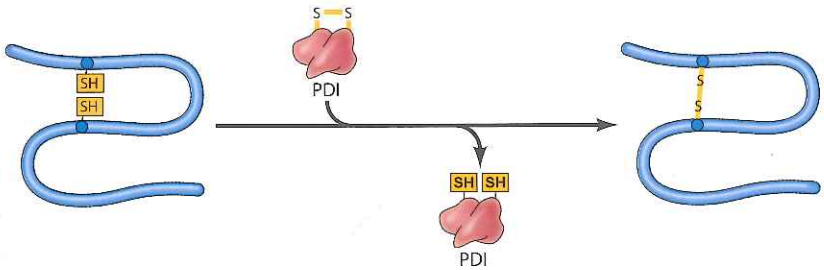
(Şekil 9.26A). Örneğin, Alzheimer hastalığı hastalarının beynindeki nöronlarda amiloid plaklarların varlığı ile karakterize edilmektedir. (Şekil 9.26B). Bu plaklar, Amiloid Öncül Protein adı verilen transmembran proteinin kesim fragmenti olan amiloid β proteinin (Aβ) kümeleşmesi sonucu oluşur. Tablo 9.2'de gösterildiği gibi diğer proteinlerin amiloid kümelerinin oluşması Tip 2 diyabet ve sistemik amiloidosis gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. Çeşitli hastalıkların gelişmesinde protein kümeleşmesinin farklı

roller oynaması olasıdır. Örneğin farklı hastalık grupları olan sistemik amiloidosiste farklı proteinler (immünglobilin hafif zinciri gibi) fazla miktarda, tüm vücuda yayılan ve çeşitli organlarda biriken amiloid kümeleri oluşur. Bu durumda hayati organların (kalp ve böbrek gibi) amiloid kümeleri tarafından yapı ve fonksiyonlarının bozulması hastalıklara neden olur. Buna karşılık, nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde amiloid oluşumunun rolü tam net değildir. Bu hastalıklar, amiloid kümelerin oluşumundan çok hatalı katlanmış proteinlerin hücrelerde tetiklediği hasarlardan kaynaklanır. Örneğin: yeni deliller Alzheimer hastalığının amiloid plak birikmesi nedeni ile değil Aβ oligomerlerinin çözünen formlarının toksisitesi sonucu oluştuğunu düşündürmektedir.

Bir grup transfer edilebilen nörodejeneratif hastalıklar "*transmissible spongiform encephalopathies*" adı verilen nadir hastalıkların çalışmaları, **prion** adı verilen kendini replike etme kapasitesine sahip hatalı katlanmış proteinlerin karakterizasyonuna olanak vermiştir. Bunlar koyunlarda skrapi, deli dana, Creutzfeldt-Jakob hastalığı ve kuru hastalıklarıdır. Bakteri veya virüslerin aksine bu hastalıklardan sorumlu olan enfeksiyöz etken nükleik asitleri inaktive eden nükleazlar veya UV-radyasyonu ile muameleye dirençli, fakat proteini parçalayan etkenlere duyarlı bulunmuştur. 1982'de Stanley Prusiner skapiye neden olan, sadece proteinden oluşan enfeksiyöz partikül izole etti. Bu nükleik asiti olmayan partiküle, proteine benzeyen enfeksiyöz partikül olduğunu belirten prion adını verdi. Prionların enfektivitesi prion proteini, PrP tarafından oluşturulan amiloidlere dayanır. PrP memeli hücrelerinde kendi normal α-helikal formunda eksprese olur, PrP^c olarak adlandırılır. Enfeksiyöz form, PrP'nin hatalı katlanmış, PrP^{Sc} olarak tanımlanan amiloid halidir. Önemli olan PrP^{Sc}'nin, PrP^c'nin hatalı katlanmasını tetikleyerek amiloid PrP^{Sc} birikmesini uyarmasıdır (**Şekil 9.27**). Böylece, PrP^{Sc} hücreleri enfekte edebilir ve PrP^c endojen otokatalitik amiloid oluşumunu uyararak enfeksiyöz partikül içinde nükleik asite gerek duymaksızın replike olur. Yukarıda tartışılan nörodejeneratif hastalıklarda (Alzheimer hastalığı gibi) amiloid oluşturan proteinler prionlara benzer şekilde hatalı katlanmış proteinler olup, daha ileri hatalı katlanmalara ve kümeleşmelere yol açabilirler. Bu nedenle, prion hastalıkları da nörodejeneratif hastalıkların bu yaygın formlarına yol açabilir.



Şekil 9.27 Prion çoğalması Prion protein PrP^{Sc}, doğal olarak bulunan PrP^c'nin yanlış katlanması uyararak amiloid PrP^{Sc} durumuna dönüşmesini uyarır. Büyüyen amiloid fiberleri fragmanlarına ayrışarak yeni PrP^{Sc} partiküllerini oluşturur.



Şekil 9.28 Protein disülfit izomerazın görevi Protein disülfit izomeraz (PDI) substratına oksitleyici eşdeğerlerinin transferi ile disülfit bağlarının oluşumunu katalizler.

Şekil 9.29 Peptidil prolil izomeraz'ın görevi Peptidil prolil izomeraz, prolin içeren peptid bağlarının *cis* ve *trans* konformasyonlar arası izomerizasyonu katalizler.

Protein katlanmasını katalize eden enzimler

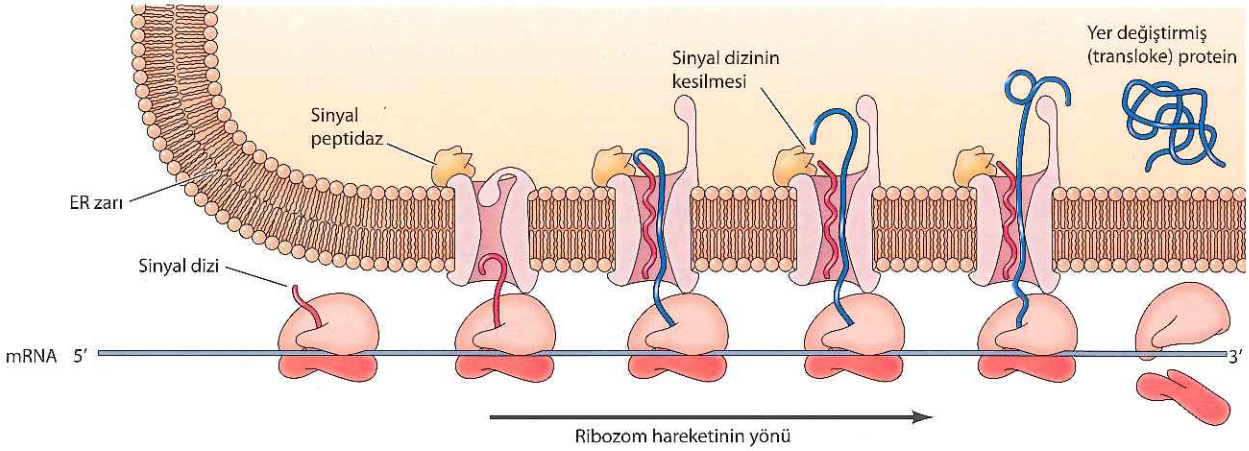
Kısmen katlanmış ara ürünlere bağlanıp stabilize ederek protein katlanmasını kolaylaştıran şaperonlara ilave olarak hücreler, protein katlanmasını katalizleyen en az iki tip enzim bulundururlar. Birçok proteinin katlanmış yapısının kararlı hale gelmesinde, sistein amino asitleri arasındaki disülfit bağı oluşumu önemlidir (bkz. Şekil 2.16). Christian Anfinsen tarafından 1963 yılında keşfedilen **protein disülfit izomeraz** (PDI), disülfit bağlarının oluşumunu katalizler (**Şekil 9.28**). Çok sayıda sistein içeren proteinler için, protein disülfit izomeraz disülfit çiftleri arasında hızlı değişimi artırarak önemli rol oynar, böylece proteinin en kararlı konformasyonu ile uyumlu disülfit düzenine erişmesine imkan verir. Disülfit bağları genellikle salgılanan proteinler ve zar proteinleri ile sınırlıdır, çünkü sitozol sisteinleri indirgenmiş formunda (-SH) tutacak redükleyici ajanlar içerir ve böylece disülfit (S-S) bağı oluşumu engellenir. Ökaryot hücrelerde disülfit bağları, içinde oksitleyici ortamın bulunduğu endoplazmik retikulumda oluşur. PDI endoplazmik retikulumda bulunan çok önemli bir katalist ve şaperon olup bu organelde en fazla bulunan proteindir.

Protein katlanmasında rol oynayan ikinci enzim prolinlerin katıldığı peptid bağlarının izomerizasyonunu katalizler (**Şekil 9.29**). Prolin, peptid bağlarının *sis* ve *trans* konformasyonunu eşit dağılımdan biraz daha *trans* forma geçmesini tercih ettiren sıra dışı bir amino asittir. Buna karşılık, diğer amino asitler arasındaki peptid bağları hemen her zaman *trans* formdadır. Proteinlerin katlanmasında hız sınırlayıcı aşama olma özelliği taşıyan prolil-peptid bağlarının *sis* ve *trans* konfigürasyonları arasındaki izomer dönüşümü **peptidil prolil izomeraz** enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzim prokaryot ve ökaryotlarda yaygın olarak bulunur ve bazı proteinlerin katlanmasında önemli rol oynar.

Protein kesimi

Birçok proteinin olgunlaşmasında polipeptid zincirinin kesilmesi **(proteoliz)** önemli bir aşamadır. En basit örnek, ribozomda oluşmaya başlayan polipeptidin amino terminalindeki başlatıcı metiyoninin polipeptidden uzaklaştırılmasıdır. Daha sonra, amino ucuna genellikle asetil grubu veya yağ asidi zinciri gibi (yakında söz edilecek) kimyasal grupların eklenmesi gerçekleşir.

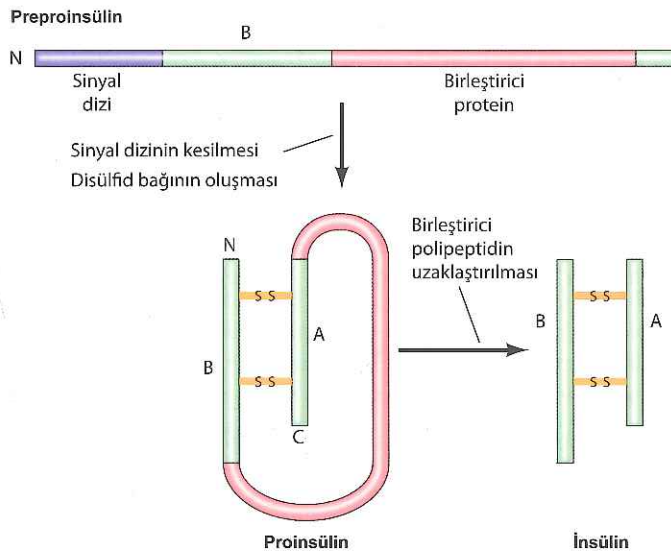
Amino ucunun proteolitik modifikasyonu, bakterilerde ve ökaryotlarda salgı proteinleri ile, ökaryotlarda plazma zarına, lizozoma, mitokondriye ve kloroplastlara katılacak proteinlerde olduğu gibi, zarı geçecek birçok proteinin translokasyonunda da önemli rol oynar. Bu proteinler, gidecekleri yere, amino ucu **sinyal dizileri** sayesinde iletildikten sonra, amino terminal dizileri proteolitik kesimle uzaklaştırılır. Örneğin, yaklaşık 20 amino asit uzunluktaki bu amino terminal sinyal dizileri, daha translasyon devam ederken, salgılanacak proteinleri ökaryotlarda endoplazmik retikuluma veya bakteride plazma zarına hedefler (**Şekil 9.30**). Çoğunlukla hidrofilik amino asitlerden oluşan sinyal dizileri, ribozomda sentez aşamasında membran kanallarına girer. Polipeptid zincirinin kalan kısmı ise, sentez ilerledikçe membran kanalından geçer. Daha sonra sinyal dizi, özgül bir membran proteazı tarafından **(sinyal peptidaz)** kesilir ve olgun protein serbest



Şekil 9.30 Membran translokasyonunda sinyal dizilerin rolü Sinyal diziler, polipeptid zincirinin, bakteride plazma zarından veya ökaryot hücrelerde endoplazmik retikulum zarından geçişini (burada görülüyor) hedefler. Polipeptid zincirinin amino ucunda yer alan, hidrofobik amino asitler içeren sinyal dizi, ribozomda belirir belirmez zar kanalına girer. Daha sonra polipeptidin geri kalan kısmı da kanala girer ve sinyal peptidazın etkisi ile sinyal dizi kesilerek, olgun protein serbest kalır.

kalır. Ökaryot hücrelerde sentezlenen polipeptid zincirinin endoplazmik retikuluma aktarılması, proteinlerin salgılanması, plazma zarına ya da lizozoma katılmak için hedeflenmesindeki ilk aşamadır. Proteinlerin gideceği yere taşınımını yönlendiren mekanizmalar ve proteinlerin mitokondri ve kloroplasta alınmasını hedefleyen diğer dizilerin rolü Bölüm 11 ve 12'de detaylı olarak tartışılacaktır.

Proteolitik işlenmeye diğer bir önemli örnek de, aktif enzim veya hormonların daha büyük öncüllerinden kesimle oluşmalarıdır. Büyük bir



Şekil 9.31 İnsülinin proteolitik işlenmesi Olgun insülin, disülfit bağları ile bağlanmış iki polipeptid zincirinden (A ve B) oluşur. Amino ucunda, sentezlenmekte olan polipeptidin endoplazmik retikuluma transferi sırasında kesilip çıkarılan bir sinyal dizi içeren öncül polipeptid (preproinsülin) olarak sentezlenir. Bu kesim daha sonra, aradaki birleştirici polipeptidin yıkılarak uzaklaştırılması sonucu insüline dönüşek olan, ikinci bir öncülü (proinsülin) verir.

öncül polipeptid olarak sentezlenen insulin iyi bir örnektir. İnsülin kesim ile yapılanır. Başlangıç öncülü (preproinsulin) polipeptidi endoplazmik retikuluma hedefleyen bir amino ucu sinyal dizisi taşır (**Şekil 9.31**). Endoplazmik retikuluma transfer sırasında sinyal dizilerin uzaklaştırılması proinsulin adı verilen ikinci öncülü verir. Bu öncül daha sonra, aradaki bir peptid grubunun proteolitik uzaklaştırılması ile insuline (disülfit bağı ile bir arada tutulan iki zincirden oluşur) çevrilir. Kanın pıhtılaşması, sindirim enzimleri ve hayvanlarda programlı hücre ölümünü düzenleyen proteaz serileri gibi diğer proteinler de benzer kesim süreçleri ile aktive olurlar.

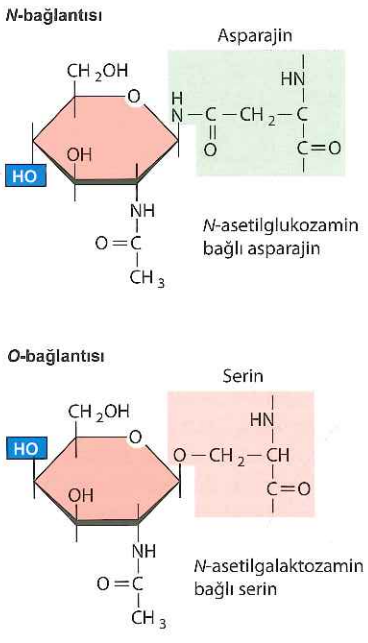
Birçok hayvan virüsünün proteinlerinin de büyük öncüllerden kesimle türetilmeleri ilginçtir. Proteoliz işleminin virüs replikasyonunda özellikle önemli olduğunu gösteren bir örnek HIV'den gelmektedir. HIV'in replikasyonunda virüs tarafından kodlanan bir proteaz viral yapısal proteinleri öncül polipeptidi oluşturmak üzere keser. Virüs replikasyonundaki temel rolü nedeni ile HIV proteaz (revers transkriptaza ek olarak), AIDS tedavisinde kullanılmak üzere ilaç geliştirilmesinde önemli bir hedeftir. Gerçekte de bu proteaz inhibitörleri bu hastalıkla savaşta elimizde olan ajanlar içinde en etkin olanlardan biridir.

Glikozillenme

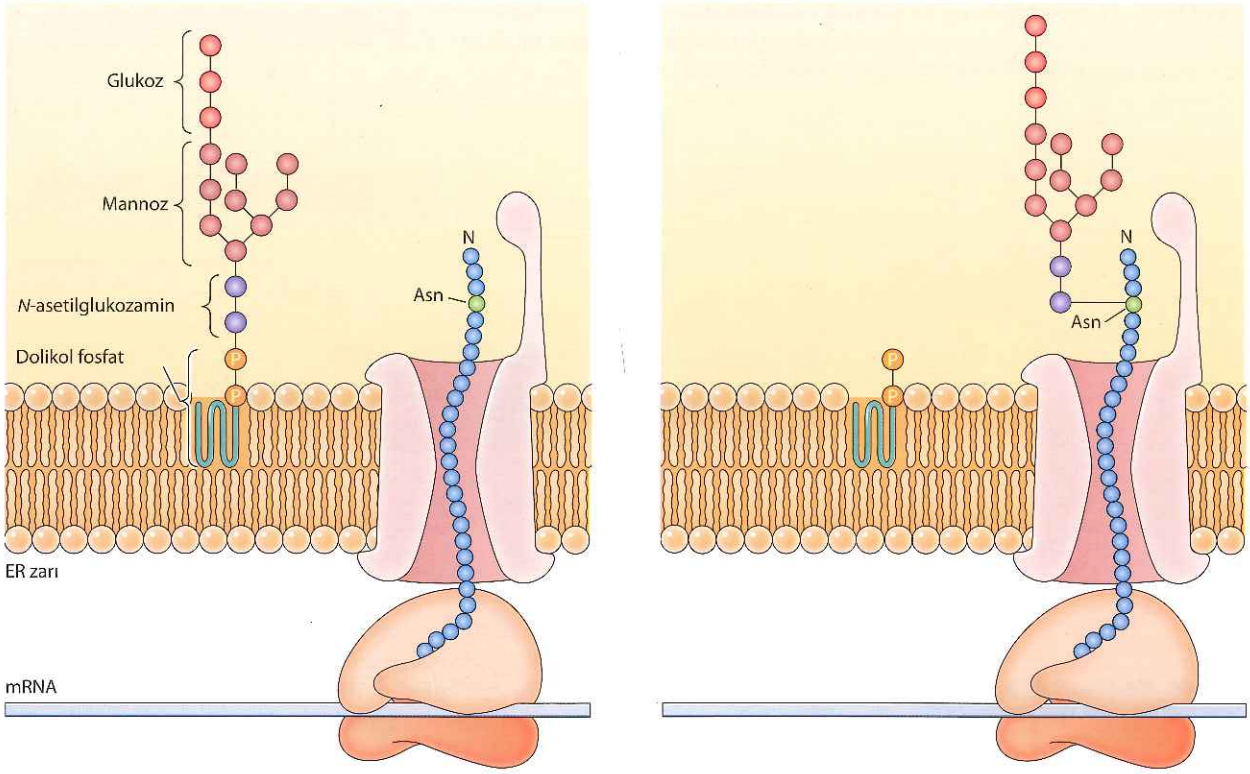
Birçok protein, özellikle ökaryot hücrelerde, **glikozillenme** adı verilen süreçte, karbohidrat eklenerek değiştirilir. Birçok nükleer ve sitoplazmik protein de glikozillenmekle birlikte, karbohidrat zincirinin eklendiği proteinler (**glikoprotein** olarak adlandırılırlar) genellikle salgılanır veya hücre yüzeyinde yer alırlar. Glikoproteinlerin karbohidrat kısımları endoplazmik retikulumda protein katlanmasında, proteinlerin uygun hücresel bölgelere hedeflenmesinde ve hücre-hücre etkileşim bölgelerinin tanınmasında önemli rol oynar.

Glikoproteinlerin çoğu karbohidrat yan gruplarının takılma bölgesine bağlı olarak *N*-bağlı veya *O*-bağlı olarak sınıflandırılırlar (**Şekil 9.32**). *N*-bağlı glikoproteinlerde karbohidrat, asparajin yan grubundaki nitrojen atomuna takılır. *O*-bağlı glikoproteinlerde, treonin veya serin yan grubundaki oksijen atomu karbohidrat için takılma bölgesidir. Bu pozisyonlara doğrudan bağlanan şekerler genellikle *N*-asetilglukozamin veya *N*-asetilgalaktozamindir. İlave olarak mannoz birimleri bazı proteinlerdeki triptofan kalıntılarına karbon-karbon bağı ile bağlanır.

Ökaryot hücrelerdeki glikoproteinlerin çoğu salgılanma veya plazma zarına katılmak üzere hedeflenmişlerdir. Bu proteinler, genellikle daha sentezleri devam ederken, endoplazmik retikuluma transfer olurlar. Glikozillenme de endoplazmik retikulumda translasyon tamamlanmadan önce başlar. İlk aşama, yaygın olarak bulunan 14 şekerli bir oligosakkaridin (2 *N*-asetilglukozamin, 3 glukoz ve 9 mannoz), sentezlenmekte olan polipeptid zincirindeki bir



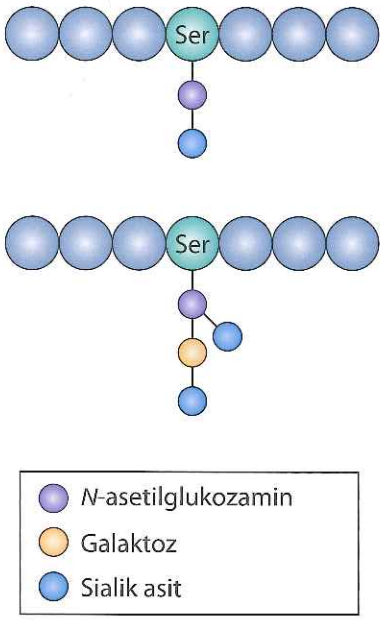
Şekil 9.32 Glikoproteinlere karbohidrat yan zincirlerinin takılması *O*-bağlı glikoproteinlerde karbohidrat zincirleri serin (görülmekte) veya treonine takılırken, *N*-bağlı glikoproteinlerde asparajine takılır. Amino asitlere bağlanan şekerler genellikle *N*-asetilglukozamin (*N*-bağlı) veya *N*- asetilgalaktozamindir (*O*-bağlı).



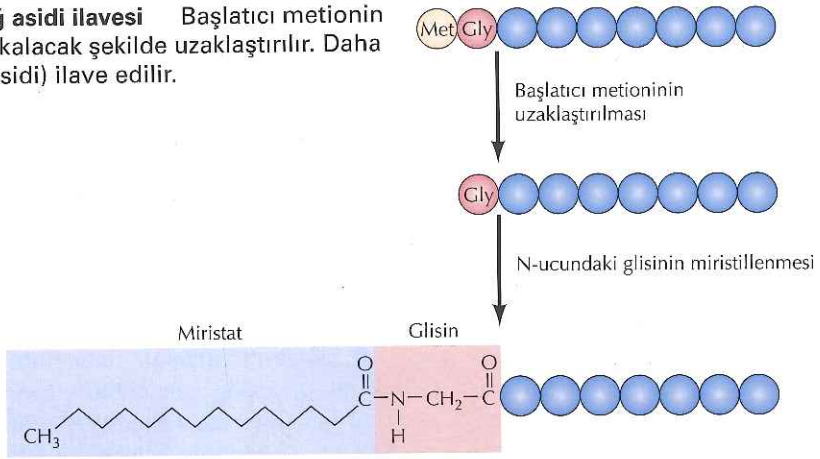
Şekil 9.33 *N*-bağlı glikoproteinlerin sentezi Glikozillenmede ilk adım, uzayan polipeptid zincirine endoplazmik retikulumda (ER) 14 şekerden oluşan oligosakkaridin ilavesidir. Oligosakkarid (iki *N*-asetilglukozamin, dokuz mannoz ve üç glukoz ünitesinden oluşur) ER zarında bir lipid taşıyıcısı (dolikol fosfat) ile birleşir. Daha sonra tek birim olarak polipeptidin alıcı asparajinine aktarılır.

asparajine transferidir (Şekil 9.33). Oligosakkarid endoplazmik retikulumdaki bir lipid taşıyıcı üzerinde **(dolikol fosfat)** eklenir. Daha sonra, bütün bir birim halinde, Asn-X-Ser veya Asn-X-Thr dizisi (X prolin dışında herhangi bir amino asid olabilir) taşıyan bir alıcı asparajin (Asn) kalıntısına transfer edilir. Bölüm 11'de tartışıldığı gibi, *N*-bağlı yaygın oligosakkaritler daha sonra karbohidrat birimlerinin ilavesi ve uzaklaştırılması ile modifiye edildiğinden, sonuçta proteinler çok çeşitli *N*-bağlı oligosakkarit içerebilirler.

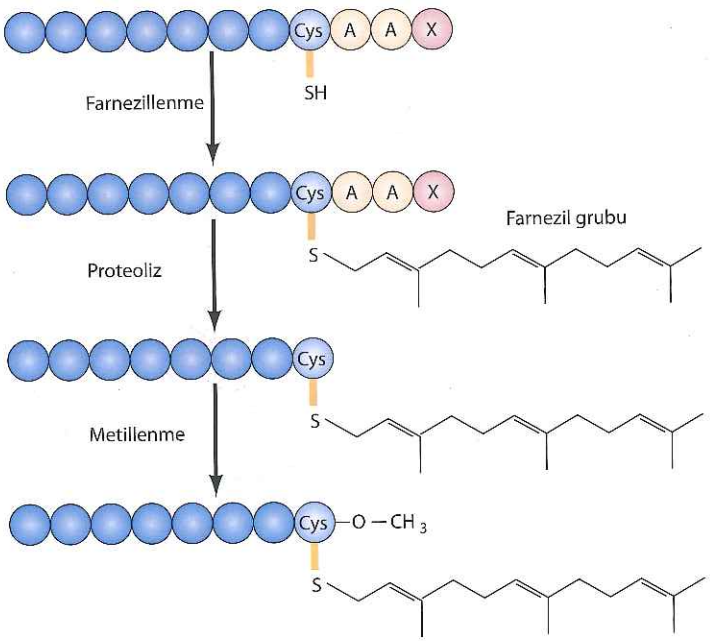
O-bağlı oligosakkaridlerin çoğu de Golgi aygıtı içerisinde eklenir. *N*-bağlı oligosakkaridlere karşılık, *O*-bağlı oligasakkaritler birkaç şeker biriminin, her seferinde teker teker eklenmesi ile oluşurlar (Şekil 9.34). Bunula birlikte, bazı *O*-bağlı oligosakkaritler, salgılanan hücre dışı matriks proteoglikanları gibi, çok sayıda uzun zincirli şeker içerirler (Bölüm 15'te tartışıldı). Çeşitli transkripsiyon faktörleri de dahil olmak üzere birçok sitoplazmik ve nükleer protein de, sitozoldeki farklı enzim sistemleri tarafından katalizlenen tek bir *O*-bağlı *N*-asetilglukozamin ilavesi ile değiştirilirler. Bu sitoplazmik ve nükleer proteinlerin glikolizasyonunun onların aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülse de O-glikolizasyonun sonuçları hala tam olarak anlaşılamamıştır.



Şekil 9.34 *O*-bağlı oligosakkarid örnekleri *O*-bağlı oligosakkaridler, genellikle, şekerlerin birer birer eklendiği birkaç karbohidrat ünitesinden oluşur.



Şekil 9.35 N-miristillenme ile bir yağ asidi ilavesi Başlatıcı metionin polipeptid zincirinin N-ucunda glisin kalacak şekilde uzaklaştırılır. Daha sonra miristik asit (14 karbonlu yağ asidi) ilave edilir.

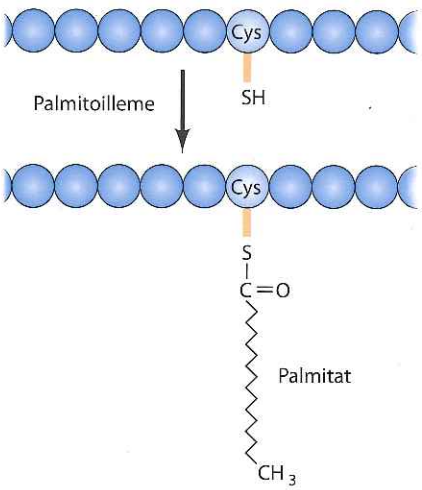


Şekil 9.36 C-ucu sisteinlerin prenillenmesi Prenillenmenin tipi Ras proteinlerini ve çekirdek zarfını (nükleer laminler) etkiler. Bu proteinler C-ucunda sistein (Cys) ve onu takip eden iki alifatik amino asit (A) ve herhangi bir diğer amino asit (X) ile sonlanır. Modifikasyonlarındaki ilk aşama, 15 karbonlu farnezil grubunun sisteinin yan zincirine ilavesidir (farnezillenme). Bu aşamayı, C-ucundaki üç amino asidin proteolitik olarak uzaklaştırılması ile, C-ucunda yer alan sisteinin metillenmesi izler.

Lipidlerin takılması

Ökaryot hücrelerde bazı proteinler polipeptid zincirine lipid takılması ile modifiye olurlar. Hidrofobik lipidler zarlarla etkileşebildikleri için bu değişiklikler, proteinleri plazma zarına yönlendirir ve yerleştirir (bkz. Şekil 2.34). Plazma zarının sitozolik yüzü ile ilişkili olan ökaryot proteinlerinde -N-miristillenme, prenillenme ve palmitoillenme- olmak üzere üç genel tipte lipid eklentisi yaygındır. Dördüncü bir modifikasyon glikolipidlerin ilavesidir ki, hücre yüzey proteinlerini, plazma zarının hücre dışına bakan yüzüne yerleştirmede önemli rol oynar.

Bazı proteinlerde, proteine translasyon sırasında uzamakta olan polipeptid zincirinin amino ucuna bir yağ asidi takılır. **N-miristillenme** olarak adlandırılan bu işlemde, miristik asit (14 karbonlu bir yağ asidi) bir glisin eklentisinin N-ucuna takılır (Şekil 9.35). Glisin genellikle polipeptid zincirine katılan ikinci amino asittir, yağ asidi eklenmesinden önce başlatıcı metionin proteolitik kesimle uzaklaştırılır. N-miristoillenerek değişen birçok protein plazma zarının iç yüzü ile ilişki halindedir ve bu ilişkide yağ asitlerinin rolü, N-ucu glisinin, alanin ile değiştiği mutant proteinlerin analizi ile gösterilmiştir. Bu yer değiştirme miristillenmeyi önler ve proteinin zar ile ilişkisini inhibe ederek mutant proteinlerin fonksiyonlarını bloklar.

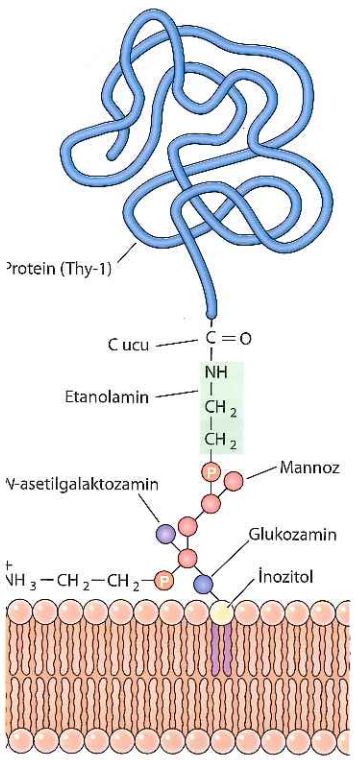


Şekil 9.37 Palmitillenme Palmitik asid (16 karbonlu bir yağ asidi) içteki bir sisteinin yan zicirine eklenir.

Lipidler sistein, serin ve treonin amino asitlerinin yan zincirlerine de bağlanabilir. Bu tipde modifikasyonun önemli bir örneği **prenillenmedir**. Burada özgül tipte lipidler (prenil grupları), polipeptid zincirinin C-ucuna yakın bölgede yerleşik sistinlerin yan zincirlerindeki kükürt atomuna bağlanırlar (Şekil 9.36). Çeşitli insan kanserlerindeki kontrolsuz çoğalmadan sorumlu olan Ras onkogen proteini de dahil olmak üzere, hücre çoğalma ve farklılaşmasının kontroluna katılan plazma zarı ile ilişkili birçok protein bu şekilde modifiye olur (bkz. Bölüm 19). Bu proteinlerin prenillenmesi üç aşamada gerçekleşir. İlk olarak, prenil grubu, polipeptid zincirinin karboksi ucundan üç amino asit önce yer alan sisteine eklenir. Bu reaksiyonda takılan prenil grubu ya farnesil (Şekil 9.36'de görüldüğü gibi 15 karbonlu) ya da geranil-geranildir (20 karbonlu). Daha sonra sisteini takibeden amino asitler uzaklaştırılır ve sistein karboksi ucunda kalır. Son olarak C-ucundaki sistein amino asidinin karboksil grubuna bir metil grubu eklenir.

Üçüncü bir yağ asidi modifikasyon tipi; 16 karbonlu bir yağ asidi olan palmitik asidin iç sistinlerin yan grubundaki kükürt atomlarına eklenmesiyle gerçekleşen **palmitillenmedir** (Şekil 9.37). N-miristillenme ve prenillenme gibi, palmitillenme de bazı proteinlerin plazma zarının sitozolik yüzüne bağlanmasında önemli rol oynar.

Son olarak, oligosakkaridlere bağlı lipidler **(glikolipidler)**, bazı proteinlerin C-ucu karboksil grubuna eklenerek, bu proteinlerin plazma zarının dış yüzüne yerleşmeleri sağlanır. Bu proteinlere takılı olan glikolipidler, fosfotidilinositol içerdikleri için, genellikle **glikozilfosfotidilinositol** veya **GPI çapası** olarak adlandırılırlar (Şekil 9.38). GPI'ların oligosakkarid kısmı, polipeptid



Şekil 9.38 GPI çapasının yapısı C-ucuna takılan GPI çapası, proteini plazma zarına tutturur. Bu bağlantı grubu C-ucundaki amino aside, mannoz, *N*-asetil galaktozamin ve glukozamin birimlerinden oluşan oligosakkaride bağlı etanolamin aracılığı ile tutunur. Oligosakkarid de, fosfotidilinositolün inositol grubuna bağlanır. Lipidin iki yağ asidi zinciri de plazma zarına gömülür. Burada görülen GPI çapası, sıçan proteini Thy-1'e aittir.

zincirlerinin uç karboksil gruplarına bağlıdır. Fosfotidilinositolün inositol grubu da oligosakkaride bağlanır, böylece karbohidratlar fosfolipidlerin yağ asidi ve proteinleri arasında köprü görevi görürler. GPI çapaları tam yapılanmamış birimler olarak endoplazmik retikulumda sentezlenir ve proteinlere eklenir. Bunların eklenmesi, polipeptid zincirinin C- ucundan yaklaşık 20 amino asidlik peptidin kesimi ile birliklikte gelişir. Daha sonra GPI gruplarındaki yağ asidi zincirlerinin plazma zarına bağlanmayı yönlendirmesi ile, değiştirilmiş proteinler hücre yüzeyine taşınırlar.

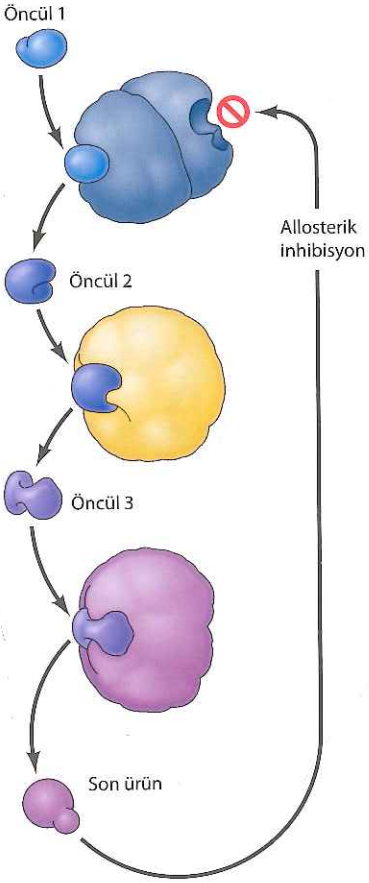
Protein Fonksiyonunun Düzenlenmesi

Proteinlerin en önemli işlevlerinden biri, tüm biyolojik reaksiyonların katalizi için gerekli olan, enzim aktiviteleridir. Bu yüzden enzim aktivitesinin düzenlenmesi, hücre davranışlarını belirlemede anahtar rol oynar. Hücre bunu kısmen sentezlenecek enzim (protein) miktarını belirleyecek gen ekspresyonu düzeyinde başarır. Daha ileri düzeyde bir kontrol ise proteinlerin sadece miktarını değil aynı zamanda aktivitelerini de kontrol etmeye imkan veren protein işlevinin denetimi ile sağlanır. Translasyon ve transkripsiyon süreçlerine katılan proteinlerin bir kısmının, aktivitelerinin düzenlenmesi ve hücre davranışlarının kontrolunda rol alan kontrol edilebilir proteinlerin bir çok örneği daha önceki ve sonraki bölümlerde tartışılmıştır. Bu bölümde hücresel proteinlerin kontrolundaki üç genel mekanizma tartışılmaktadır.

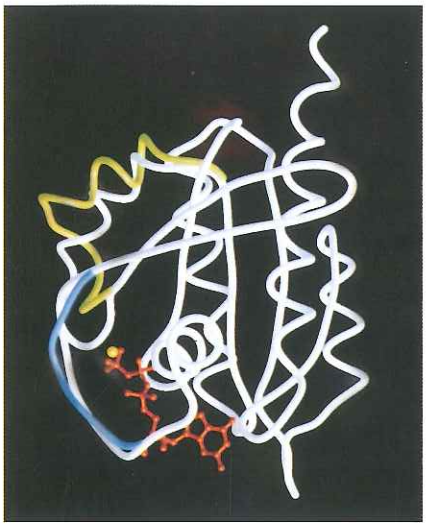
Küçük moleküllerle düzenlenme

Enzimlerin çoğunun katalitik aktiviteleri, konformasyon değişimleri ile kontrol edilmektedir. Birçok durumda bu konformasyonel değişim enzim aktivitesini düzenleyen nükleotidler veya amino asitler gibi küçük moleküllerin bağlanması sonucunda ortaya çıkar. Bu tip düzenlenme genellikle, geribesleme (feedback) inhibisyonu yoluyla kontrolden sorumludur. Örneğin, biyosentez yolaklarının bir çoğunda, son ürün (örn., amino asitler) kendi sentez yolağındaki ilk basamağı katalizleyen enzimi inhibe eder, böylece gereksiz miktarda sentezi önleyerek yeterli miktarda ürün sağlanmasını garantiler (**Şekil 9.39**). Geribesleme inhibisyonu, enzimin katalitik bölgesi dışında bir yere düzenleyici molekülün bağlanması ile ortaya çıkan **allosterik düzenlenmeye** (*allo*=diğer; *sterik*=bölge) örnektir. Bunun gibi düzenleyici moleküllerin bağlanması, proteinin üç boyutlu yapısını değiştirir ve böylece, katalitik bölgenin şekli değiştiği için katalitik aktivite etkilenir (bkz. Şekil 2.29). Birçok transkripsiyon faktörü de (Bölüm 8'de tartışıldı), küçük moleküllerin bağlanması ile kontrol edilir. Örneğin, laktozun *E. coli lac* represörüne bağlanması, represörün DNA'ya bağlanmasını engelleyen biçimsel değişimi uyarır (bkz. Şekil 8.7). Ökaryot hücrelerde steroid hormonlar, benzer şekilde, transkripsiyonu düzenleyen proteinlere bağlanarak gen ekspresyonunu denetlerler.

eEF1α gibi protein translasyon faktörlerinin GTP bağlanması ile düzenlenmesi (bkz. Şekil 9.14), hücresel proteinlerin aktivitelerinin kontrolünde



Şekil 9.39 Geribesleme inhibisyonu Bir biyokimyasal yolun son ürünü, sentez yolunda ilk basamağı katalizleyen enzimin allosterik inhibitörü olarak etki eder.



Şekil 9.40 Aktif ve inaktif Ras proteinleri arasındaki konformasyon farkları Ras proteinleri GTP-bağlı aktif ve GDP-bağlı inaktif formlar arasında değişim gösterir. GTP bağlanmasına karşı GDP bağlanmasının majör etkisi, molekülün şalter I ve II bölgeleri olarak adlandırılan iki bölgesindeki konformasyon değişikliğidir. Burada, GTP kompleksinin omurgası beyazla, GDP kompleksinin, şalter I ve II omurgası sırası ile mavi ve sarı ile gösterilmiştir. Guanin nükleotid kırmızı ve Mg^{2+} sarıdır. (University of California, Berkley' den Sung-Hou Kim' in izni ile)

diğer bir yaygın mekanizmadır. Bu durumda, proteinin GDP bağlı formu inaktif iken, GTP bağlı formu aktif şeklidir. Bir çok hücresel protein benzer şekilde GTP veya GDP bağlanması ile düzenlenir. Bu proteinler arasında, hücre çoğalmasının kontrolü ve insan kanserlerindeki rolü nedeni ile yoğun bir şekilde çalışılan, Ras onkogen proteini de bulunur. Bu proteinlerin X-ışını kristallografileri, GTP-bağlı aktif ve GDP- bağlı inaktif biçimleri arasında, küçük fakat fonksiyonel olarak çok önemli, farklar olduğunu açığa çıkarmıştır (**Şekil 9.40**). Protein konformasyonundaki bu küçük farklılık, Ras'ın (aktif, GTP-bağlı formda) hücre bölünmesini uyaran hedef molekülle etkileşip etkileşemeyeceğini belirlemektedir. Protein üç boyutlu şeklindeki bu küçük farklılığın önemi, ras genindeki mutasyonların insan kanserlerinin %25'inin gelişimine katkıda bulunduğu gerçeği ile çarpıcı biçimde gösterilmiştir. Böyle mutasyonlar Ras proteininin konformasyonunu öyle değiştirir ki, protein GTP-bağlı aktif konformasyona kilitlenir ve sürekli bölünme sinyali ileterek kanser hücrelerinin kontrolsüz bölünmesine yol açar. Buna karşın, normal Ras proteini GTP ve GDP-bağlı konformasyonlar arasında değişim gösterir ve böylece, çok hücreli organizmalarda, sadece normal çoğalmayı denetleyen büyüme faktörleri ve hormonlar tarafından uyarılmayı takiben aktifleşir.

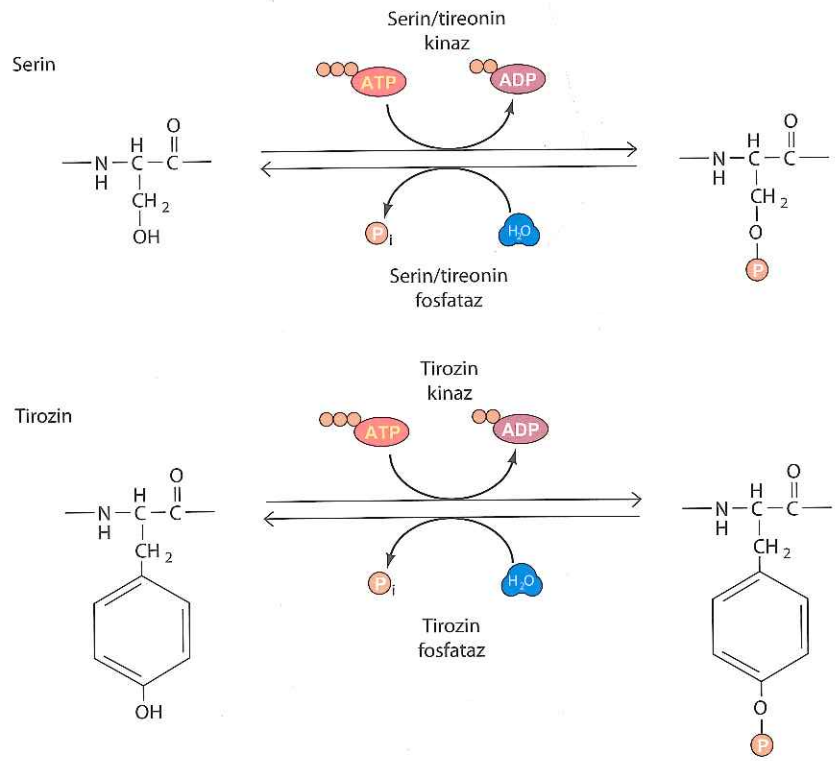
Protein fosforillenmesi ve diğer modifikasyonlar

Bir önceki bölümde tartışılan örnekler, inhibitör veya aktivatör nitelikli küçük moleküllerle proteinlerin kovalent olmayan ilişkileri idi. Kovalent bağ oluşmadığı için, bu regülatör moleküllerin proteinlere bağlanması, hücrelerin çevresel değişimlere hızlı cevap vermesine imkan verecek şekilde, kolayca geri dönüşebilir. Bununla birlikte birçok proteinin aktivitesi kovalent modifikasyonlarla da düzenlenir. Bu tipte düzenlemenin bir örneği, bazı enzimlerin inaktif öncüllerinin proteolitik kesim ile aktivasyonudur. Bu bölümde daha önce de belirtildiği gibi sindirim enzimleri ve kan pıhtılaşmasına katılan proteinler ve programlanmış hücre ölümüne katılan proteinler bu mekanizma ile kontrol edilirler. Proteoliz geri dönüşümsüz olduğu için, enzim aktivitesini çevresel değişimlere cevap olarak açıp kapamak yerine, enzim aktivasyonunun kontrolünü sağlar. Buna karşılık diğer kovalent değişimler-

özellikle fosforillenme-allosterik düzenlemede olduğu gibi kolayca geri dönüşebilir ve çevresel sinyallere cevap olarak çok çeşitli hücresel proteini, geri dönüşümlü şekilde, aktive veya inhibe ederler.

Protein fosforillenmesi, fosfat grubunu ATP'den serin, tireonin veya tirozinin yan zincirlerindeki hidroksil grubuna transfer eden **protein kinazlar** tarafından katalizlenir (**Şekil 9.41**). Protein kinazlar ökaryotlarda genlerin yaklaşık %2'sine karşı gelen en büyük gen ailesidir. Protein kinazların çoğu serin, tireonin veya tirozin amino asitlerinden fosfatlar: Bu enzimler, sırasıyla, **-serin/treonin kinazlar** veya **tirozin kinazlar** olarak adlandırılırlar. Protein fosforilasyonu, fosfatlanmış amino asitlerin hidrolizini katalizleyen **protein fosfatazlar** tarafından geri dönüştürülebilir. Bazı protein fosfatazlar her üç fosfoamino asidi tanımakla birlikte, fosfatazların çoğu, protein kinazlar gibi, serin, treonin veya tirozine özgüldür.

Protein kinaz ve protein fosfatazların birlikte çalışması ile bir çok hücresel proteinin tersinir fosforilasyonu gerçekleşir. Protein kinazlar sıklıkla sinyal iletim yolunun elemanları olarak fonksiyon görürler, yani bir kinazın aktivasyonu ikinci ve diğer kinazların üzerinde de etkili olur. Çevresel uyarıya cevap olarak hücre davranışının değişimi ile sonlanacak bir sinyal, bir seri protein kinazın ardışık faaliyeti ile hücre yüzeyinden hücre içindeki hedef proteinlere iletilir.



Şekil 9.41 Protein kinazlar ve fosfatazlar Protein kinazlar, serin ve tireonin (serin/reonin kinazlar) veya tirozin (tirozin kinazlar) yan zincirlerine ATP' den fosfat grubu transferini katalizlerler. Protein fosfatazlar aynı amino asitlerden hidroliz yoluyla fosfat gruplarının uzaklaştırılmasını katalizlerler.

Protein - Tirozin Kinazın Keşfi

Transforming Gene Product of Rous Sarcoma Virus Phosphorylates Tyrosine

Tony Hunter and Bartholomew M. Sefton
The Salk Institute, San Diego, CA

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1980, Volume 77, pages 1311-1315

Bağlam

Raus Sarkoma virüsü (RSV) 1911'de izole edilmesini takiben genellikle hayvanlarda tümör oluşturan ilk virüs olarak kabul edildi (Bkz. Bölüm 1 Moleküler Tıp kutucuğu). Daha sonra RSV çeşitli özellikleri nedeni ile kanser gelişimini anlamak için cazip bir model haline geldi. Özellikle RSV'nin küçük genomu, kanser hücrelerinin karakteristik özelliği olan anormal çoğalmadan sorumlu genlerin tanımlanması için bir umut oldu. Bu amaç 1970'lere gelindiğinde tek bir RSV geninin (sarkoma için *src* adı verilen) tümör uyarımı için gerekli olduğunun saptanması üzerine hedefine ulaştı. Daha da önemlisi, insanlar dahil olmak üzere omurgalıların çoğunda *src* genine yakın benzerlik gösteren genlerin normal genomun bir kısmı olarak bulunuyor olması idi. Viral src proteini kanser hücrelerinde kontrolsuz çoğalmadan sorumlu olduğuna göre, src fonksiyonunun öğrenilmesi kanser uyarılmasının ve normal hücre çoğalmasının moleküler temellerini anlamada önemli fikirler verecektir.

1977'de Ray Erikson ve arkadaşları RSV tarafından uyarılmış tümörü olan hayvanların anti serumları ile immünçöktürme (bkz. Şekil 5.11) yaparak src proteinini tanımladılar. Kısa bir süre sonra da src-immünçökeltilerde immünglobülin moleküllerinin radyoaktif ATP ile inkübe edilmesi sonucunda, immüglobülin moleküllerinin fosforile olduğu bulundu. Bu nedenle Src'nin bir protein kinaz olduğu, hücre çoğalmasının kontrolunda da protein fosforilasyonunun rolü olduğu açıkça görüldü.

Daha önce çalışılan tüm protein kinazlar serin veya treonin amino asitlerinden fosforile ediyor olup hayvan hücrelerinde saptanan tek fosfo-aminoasitler de bunlardı. Walter Eckhardt ve Tony Hunter 1979'da diğer bir hayvan tümör virüsü (polyoma virüs) onkojenik proteininin tirozin amino asidinden fosforillediğini gözlediler. Bu nedenle, Hunter ve Bartholomew Sefton src'nin de substrat proteinleri serin/treonin yerine tirozinden fosforile edebileceği olasılığını test ettiler. Deneyleri gerçekten de Src'nin protein tirozin kinaz olarak görev yaptığını gösterdi, bu aktivitenin hücre sinyal yolağında merkezi rol oynadığı günümüzde de kabul edilmektedir.

Deneyler

Hunter ve Sefton Src immünçökeltilerini ^{32}P-işaretli ATP ile inkübe ederek Src tarafından fosforillenen amino asidleri tanımlamışlardır. Substrat proteinde (burada ,immünglobülin) Src tarafından fosforile edilen amino asid bu nedenle radyoaktif olarak işaretlenmişti. İmmünglobülin daha sonra izole edilip amino asitlerine hidrolize edilerek fosfotirozin, fosfoserin ve fosfotreonini ayıran elektroforez ve kromatografi metodları ile analiz edildi (Bkz. Şekil). Bu deneyde saptanan radyoaktif amino asit fosfotirozindi ve Src'nin özel olarak tirozinden fosforladığını gösterdi.

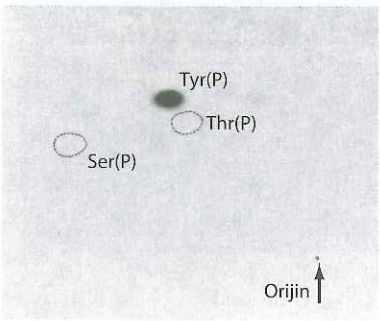
Daha sonraki deneyler viral Src gibi normal hücre Src proteinin de immünçöktürme deneyinde protein-tirozin kinaz olarak görev yaptığını gösterdi. Hunter ve Sefton bu *in vitro* deneyleri daha da ileri götürerek sağlıklı hücrelerden elde edilen proteinler içinde de fosfo tirozinin mevcut olduğunu gösterdiler. Normal hücrelerde fosfotirozinin toplam fosfo amino asitlerin %0.03'ünü oluşturması (geri kalanı fosfo serin ve fosfotreonin), neden daha önce saptanamadığını açıklıyor. Bununla birlikte fosfotirozinin RSV ile enfekte hücrelerde on kat fazla olması, viral Src proteinin artmış tirozin kinaz aktivitesinin anormal hücre çoğalmasını uyarma yeteneğinden sorumlu olduğunu düşündürdü.

Etki

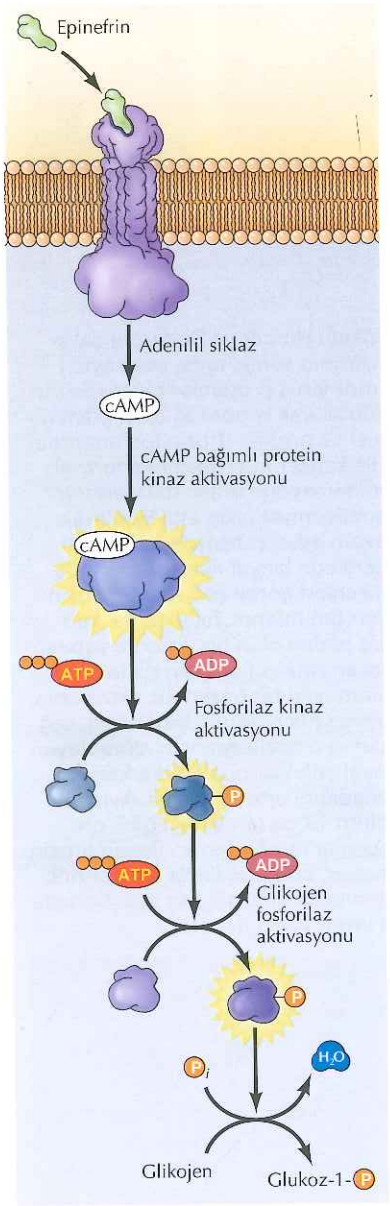
Src'nin bir tirozin kinaz olduğunun keşfi, hem yeni bir protein kinaz aktivitesinin tanımlanmasını ve hem de bu aktivitenin hücre çoğalması ile ilişkili olduğunun belirlenmesini sağladı. Hunter ve Sefton'ın çalışmalarının sonuçlarını, çok sayıda tümör virüs proteinlerinin de tirozin kinaz olarak iş gördüğünün gösterilmesi ve protein-tirozin fosforlanması ile kanser hücrelerinin anormal proliferasyonu arasındaki ilişkinin genellenmesi takip etti. Ek olarak, devam eden çalışmalarla normal hücrelerin sinyal ileti yolaklarında fonksiyon gören çok sayıda tirozin kinaz tanımlandı. Tavuklarda kansere neden olan bir virüs ile yapılan mekanizma çalışmaları daha önce bilinmeyen bir enzimatik aktivitenin, hayvan hücrelerinin büyümesi, sağ kalımı ve farklılaşmasını düzenleyen sinyal yolaklarında da merkezi rol oynadığını ortaya çıkardı. Ayrıca, Bölüm 19'da tartışıldığı gibi, onkogenler tarafından kodlanan tirozin kinazlar, bu güne kadar kanser hücrelerine karşı özgül ilaç geliştirmede en umut verici hedeftir.

Tony Hunter

Bartholomew Sefton



Src tarafından fosforlanan immünglobülinlerde fosfotirozinin tanımlanması RSV Src içeren bir immünçökelti [^{32}P]-ATP ile inkübe edildi. İmmünglobülin daha sonra izole ve hidrolize edildi. Hidrolizattaki amino asidler sellüloz ince tabaka plakaları üzerinde kromatografi ve elektroforez ile ayrıştırıldı. ^{32}P-işaretli amino asidlerin pozisyonu plakalar X-ışını filmlerine maruz bırakılarak tanımlandı. Yuvarlaklar belirteç olarak kullanılan işaretlenmemiş fosfoamino asidlerin yerleşimini göstermektedir. Başlıca ^{32}P-işaretli amino asidlerin fosfotirozin olduğuna dikkat ediniz [Tyr (P)].



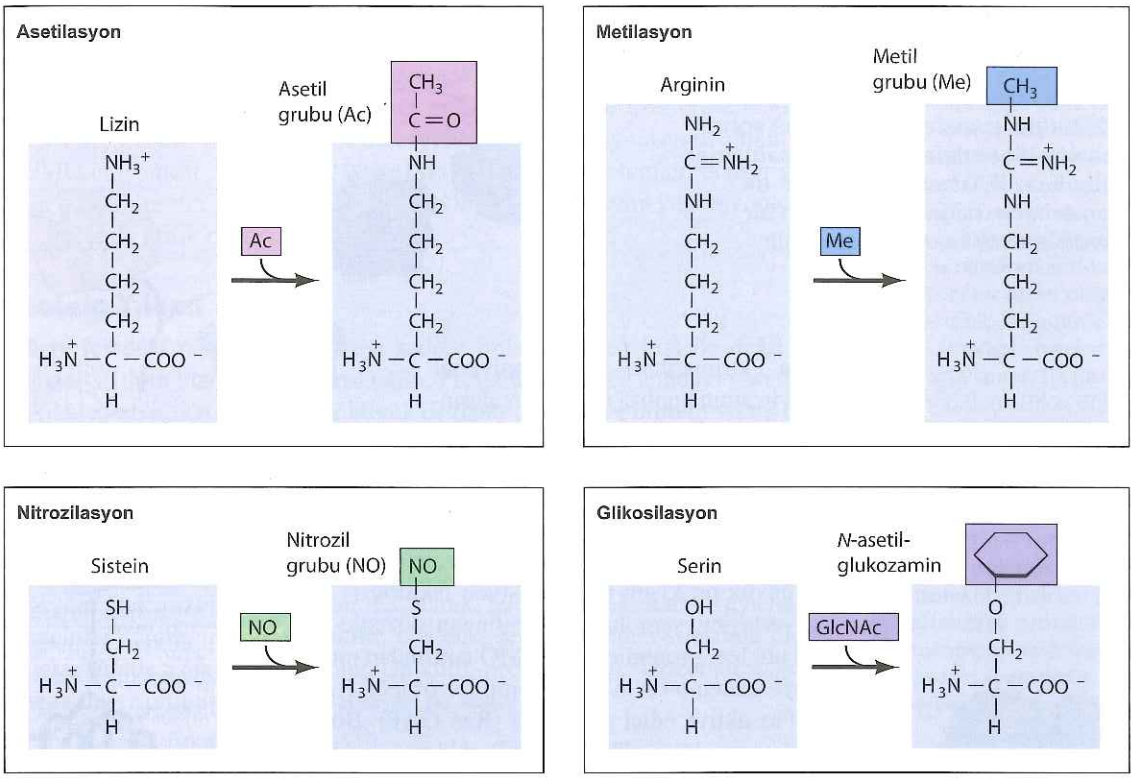
Şekil 9.42 Protein fosforillenmesi ile glikojen yıkımının düzenlenmesi Epinefrinin (adrenalin) hücre yüzeyi reseptörüne bağlanması, siklik AMP (cAMP) yapımını tetikler ki bu da, cAMP- bağımlı protein kinazı aktive eder. cAMP bağımlı protein kinaz daha sonra, fosforilaz kinazı fosfatlayarak aktive eder o da, glikojen fosforilazı fosforilleyerek aktive eder. Daha sonra glikojen fosforilaz, glikojenin glukoz 1-fosfata yıkımını katalizler.

Protein kinazların ilk örneği, 1955'de Ed Fischer ve Ed Krebs'in glikojen metabolizması çalışmalarından gelmiştir. Kas hücrelerindeki yüksek kas aktivitesi için enerji kaynağı sağlamak üzere, epinefrin (adrenalin) hormonu glikojenin glukoz-1- fosfata yıkılması için sinyal oluşturur. Glikojenin yıkımı bir protein kinaz tarafından düzenlenen glikojen fosforilaz tarafından katalizlenir (**Şekil 9.42**). Epinefrin hücre yüzeyi reseptörüne bağlanarak ATP'nin siklik AMP (cAMP)'ye dönüşümünü tetikler, bu da daha sonra cAMP bağımlı protein kinaz adı verilen bir protein kinaza bağlanır ve onu aktive eder. Bu kinaz, fosforilaz kinaz adı verilen ikinci bir protein kinazı fosfatlar ve aktive eder. Fosforilaz kinaz sırası ile glikojen fosforilazı fosforile ve aktive ederek glukoz üretimine yol açar. Fosforilaz kinaz ve glikojen fosforilazın her ikisinin de aktive edici fosforilasyonları, özgül fosfatazlarla geri dönüşebilir, böylece ilk uyarının (epinefrin) uzaklaştırılması daha fazla glikojen yıkımını inhibe eder.

Glikojen fosforilazın aktivasyonuna yol açan sinyal yolağı, küçük moleküllerin hücre yüzeyine bağlanması ile başlar-cAMP'nin cAMP bağımlı protein kinaza, epinefrinin reseptörüne bağlanması gibi. Sinyal daha sonra protein kinazların ardışık etkileri ile hücre içi hedeflere iletilir. Protein kinaz ve fosfatazların esas rol oynadığı benzer sinyal yolakları, ökaryot hücrelerin davranışlarının hemen her yönü ile düzenlenmesi için geçerlidir (bkz. Bölüm 16 ve 17). Bu yolaklardaki bozukluklar, genellikle protein kinazlardaki anormallikleri içermektedir, başta kanser gelişimi olmak üzere birçok hücre büyüme ve farklılaşma bozuklukları ile ilişkili hastalıklara neden olur. Aslında, ilk protein tirozin kinaz 1980 yılında Tony Hunter ve Bartholomew Sefton tarafından hayvan tümör virüslerinin özellikle Raus Sarkomu virüsünün onkogen proteinlerinin çalışılmaları sırasında keşfedilmiştir. Daha sonraki, çalışmalar protein tirozin kinazdaki anormalliklerin birçok insan kanserlerinin gelişmesinde rolü olduğunu ve bu enzimler hedefleyen küçük molekül inhibitörlerinin, günümüzde kanser tedavisi için geliştirilen yaklaşımlar içinde en umut vericisi olduğunu göstermiştir.

Her ne kadar protein aktivitesini düzenleyen en yaygın ve en çok çalışılan kovalent modifikasyon fosforilasyon ise de küçük moleküller tarafından gerçekleştirilen birçok diğer tip protein modifikasyonunun da önemli rolleri vardır (**Şekil 9.43**). Bunların arasında, lizinlerin asetilasyonu ve metilasyonu (Bölüm 8'de histonlara bağlı olarak tartışıldı) ile, sistemlerin yan gruplarına NO gruplarının eklenmesi de nitrozilasyon ve serin ile treoninin glikozillenmesi sayılabilir. Son proteomik çalışmaları lizin asetilasyonun prokaryot ve ökaryotlarda çeşitli transkripsiyonel düzenleyici proteinler ve metabolik enzimler de dahil olmak üzere binlerce proteini etkileyen yaygın bir modifikasyon olduğunu gösterdi.

Küçük moleküllerle modifikasyona ilave olarak bazı proteinler polipeptidlerin kovalant olarak eklenmesi ile kontrol edilir. Etkisini bu yolla

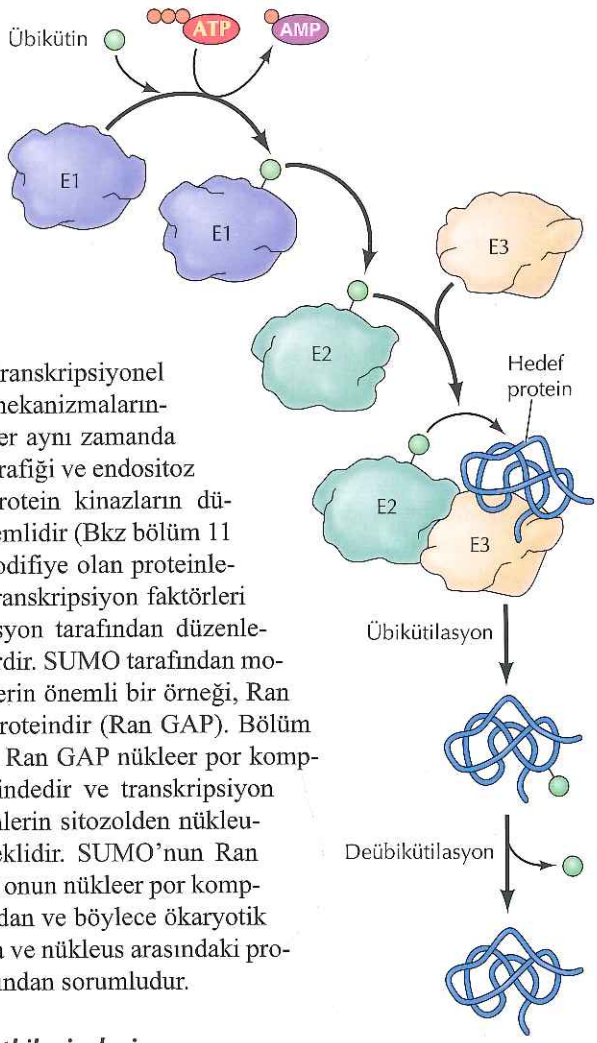


Şekil 9.43 Proteinlerin küçük moleküller tarafından modifikasyonları Fosforilasyona ek olarak proteinler, lizinlerin asetilasyonu, arjinin ve lizinlerin metilasyonu, sisteinlerin nitrozilasyonu ile serin ve treonin amino asitlerinin glikozilasyonu ile (Nasetilglukozamin ilavesi ile) de regüle edilebilir (burada gösterilmiştir).

gösterdiği bulunan ilk polipeptid ökaryotlarda çok iyi korunmuş 76 amino asitlitlik bir polipeptid olan **übikütindir**. Bu bölümün bir sonraki kısmında tartışılacağı gibi, ilk olarak übikütinin proteinleri yıkım için hedeflediği bulundu. Bununla birlikte günümüzde, proteinlerin übikütin ve **SUMO** (*small ubiquitin-related modifier*) gibi übikütin-benzeri proteinlerin eklenmesi ile modifikasyonunun çok çeşitli işlevlere hizmet ettiği tanımlanmıştır.

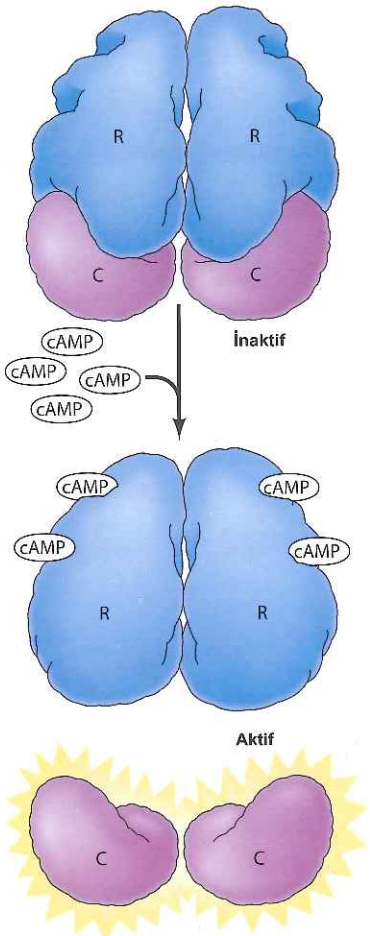
Übikütin lizin kalıntılarının yan zincirindeki amino gruplarına bağlanır. Übikütinlerin hedef proteinlere seçici ilavesi (übikütiasyon) çok aşamalı bir süreçtir (**Şekil 9.44**). İlk olarak, übikütin übikütin-aktive edici enzim E1'e bağlanarak aktive olur. Übikütin daha sonra übikütin – konjuge edici enzim (E2) adı verilen ikinci bir enzime transfer edilir. Übikütin daha sonra übikütin ligaz veya E3 adı verilen üçüncü bir protein ile kompleks oluşturan E2 tarafından hedef proteine transfer edilir. E3'ler, substrat ve E2'nin her ikisine de bağlanarak seçici olarak hedef proteinin tanınmasına aracı olurlar. Memeli hücrelerinde sadece iki übikütin E1 varken, yaklaşık 40 E2 ve 600 E3 bulunur. Daha da önemlisi, übikütin hedef proteinden deübikülütilasyon enzimleri ile uzaklaştırılabilir, yani übikütilasyon tersinir bir protein modifikasyonudur. SUMO ve diğer übikütin-benzeri proteinler benzer mekanizmalarla hedeflerine ilave edilir ve uzaklaştırılırlar.

Proteinlerin übikütin ve SUMO ile modifikasyonu çeşitli fonksiyonları etkiler. Bölüm 8'de tartışıldığı gibi, bu polipeptidlerle histonların modifikas-



Şekil 9.44 Proteinlerin übikütin tarafından modifikasyonu Übikütin ilk olarak E1 enzimleri tarafından aktive edilir. Aktive edilmiş übikütin daha sonra birçok farklı übikütin konjuge eden enzimden (E2) birine transfer edilir. Daha sonra übikütinin spesifik bir hedefe transferini sağlamak için bir übikütin ligaz (E3) hem E2'ye hem de bir substrat proteinine bağlanır. Übikütin bir deübikütinasyon enzimi ile uzaklaştırılabilir.

yonu kromatinin transkripsiyonel aktivitesinin kontrol mekanizmalarından biridir. Übikütinler aynı zamanda DNA tamiri, vezikül trafiği ve endositoz kontrolüne katılan protein kinazların düzenlenmesinde de önemlidir (Bkz bölüm 11 ve 14). SUMO ile modifiye olan proteinlerin büyük bir kısmı transkripsiyon faktörleri ve yerleşimi sumolasyon tarafından düzenlenen nükleer proteinlerdir. SUMO tarafından modifiye edilen proteinlerin önemli bir örneği, Ran GTPaz aktive edici proteindir (Ran GAP). Bölüm 10'da tartışıldığı gibi Ran GAP nükleer por kompleksleri ile ilişki halindedir ve transkripsiyon faktörleri gibi proteinlerin sitozolden nükleusa alınması için gereklidir. SUMO'nun Ran GAP'a ilave edilmesi onun nükleer por kompleksi ile bağlanmasından ve böylece ökaryotik hücrelerde sitoplazma ve nükleus arasındaki protein trafiğinin tamamından sorumludur.



Protein - protein etkileşimleri

Proteinlerin çoğu, her biri bağımsız polipeptid zinciri olan birden fazla alt birimden oluşur. Bazı proteinlerde bu alt birimler özdeştir, diğerleri ise iki ya da daha fazla birbirinden farklı alt birimden oluşurlar. Her iki durumda da, polipeptid zincirleri arasındaki ilişki protein aktivitesinin düzenlenmesi için önemlidir. Bu ilişkilerin önemi, regülatör moleküllerin bağlanması ile alt birimlerin etkileşimlerinin değiştiği allosterik enzimlerde gösterilmiştir.

Diğer birçok enzim de benzer şekilde protein-protein etkileşimi ile regüle edilmektedir. İki katalitik ve iki regülatör alt birimden oluşan cAMP-bağımlı kinaz bu duruma iyi bir örnek oluşturur (Şekil 9.45). Başlangıçta, regülatör alt birimler katalitik alt birimlerin aktivitesini engellediğinden, enzim inaktiftir. Enzim, regülatör alt birimlere bağlanan ve konformasyonal değişime yol

Şekil 9.45 cAMP- bağımlı protein kinazın düzenlenmesi İnaktif durumdaki enzim iki düzenleyici (R) ve iki katalitik (C) alt birimden oluşur. Siklik AMP (cAMP) düzenleyici alt birime bağlanır ve konformasyonel değişikliği uyararak katalitik alt birimden ayrılmasına neden olur. Serbest katalitik alt birimler ise enzimatik olarak aktiftir.

açarak kompleksin ayrışmasına neden olan cAMP tarafından aktive edilir ve serbest katalitik alt birimler artık aktif protein kinazlardır. Böylece, cAMP protein-protein etkileşimlerini değiştirerek allosterik regülatör olarak rol oynar. Daha sonraki bölümlerde tartışılacağı gibi, kendileri de üzerlerine bağlanan küçük moleküller ve protein modifikasyonları (fosforilasyolasyon, übikütin ve SUMO eklenmesi dahil olmak üzere) ile düzenlenen proteinler, benzer şekildeki protein-protein etkileşimleri yoluyla hücre davranışının çeşitli yönlerinin kontrolünde kritik rol oynarlar.

Protein Yıkımı

Hücre içindeki proteinlerin düzeyi sadece onların sentez hızı ile değil aynı zamanda yıkım hızı ile de kontrol edilir. Proteinlerin hücre içindeki yarı ömrü, dakikalardan birkaç güne kadar büyük değişim gösterir ve protein yıkım oranlarındaki farklılık hücre düzenlenmesindeki önemli kavramlardan biridir. Transkripsiyon faktörleri gibi çabuk yıkılan çoğu protein regülatör molekül olarak işlev görürler. Bu proteinlerin hızlı dönüşümü, çevreden gelen uyarılara hızlı cevap verebilmek için gereklidir. Özgül sinyallere cevap olarak çabuk yıkılan diğer proteinler ise, hücre içi enzim aktivitesinin düzenlenmesi için diğer bir mekanizma oluştururlar. Ek olarak, hücre içindeki hatalı veya hasarlı proteinler süratle tanınır ve yıkılır, böylece, protein sentezi sırasında oluşan hatalar süratle uzaklaştırılmış olur. Übikütin-proteazom ve lizozomal proteoliz olmak üzere protein yıkımını sağlayan iki ana yol vardır.

Übikütin - proteazom yolağı

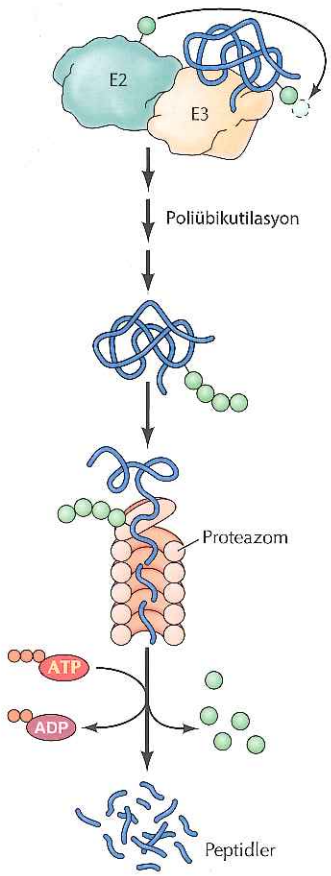
Ökaryot hücrelerde, en önemli, seçili protein yıkım yolu, sitozolik ve nükleer proteinleri süratle yıkabilmek için übikütin belirleyici olarak kullanır. Önceden de tartışıldığı gibi, Übikütin 76 amino asitlik bir polipeptiddir ve lizinlerin yan zincirindeki amino gruplarının takılması ile hedef proteinlerin çeşitli fonksiyonlarını düzenleyebilir. Proteinler, E3'ler ile katalize edilen çoklu ubikütin zincirleri oluşturmak üzere ek übikütinler eklenerek yıkım için işaretletilebileler (Şekil 9.46). Bu şekilde çok sayıda übikütin eklenmiş proteinler, **proteazom** adı verilen çok alt birimli proteaz kompleksi tarafından tanınır ve yıkılırlar.

Gen ekspresyonu ve hücre çoğalması gibi temel hücresel süreçleri kontrol eden proteinler, kontrollü übikütinlenme ve proteoliz için hedefleridir. Bu tip kontrollü yıkıma ilginç bir örneği, ökaryot hücrelerde bölünme döngüsünün ilerlemesini denetleyen proteinlerdir (siklinler olarak bilinir). (Şekil 9.47). Tüm ökaryot hücrelerin mitoza girmesi, kısmen Cdk1 olarak adlandırılan bir protein kinazın regülatör alt birimi olan siklin B tarafından kontrol edilir (bkz. Bölüm 17). Siklin B'nin Cdk1 ile birleşmesi, çeşitli hücresel proteinleri fosfatlayarak mitozu başlatan Cdk1 kinazın aktivitesi için gereklidir. Cdk1 aynı zamanda, mitozu sonlandırmak üzere siklin B'yi yıkacak übikütine bağlı proteoliz sitemini de aktive eder. Böylece siklin B'nin yıkılması Cdk1'yi inaktive eder ve hücrelerin mitozdan çıkıp bir sonraki hücre döngüsü için interfaza geçmesine olanak sağlar. Siklin B'nin übikütinasyonu çok seçici bir reaksiyondur ve siklin

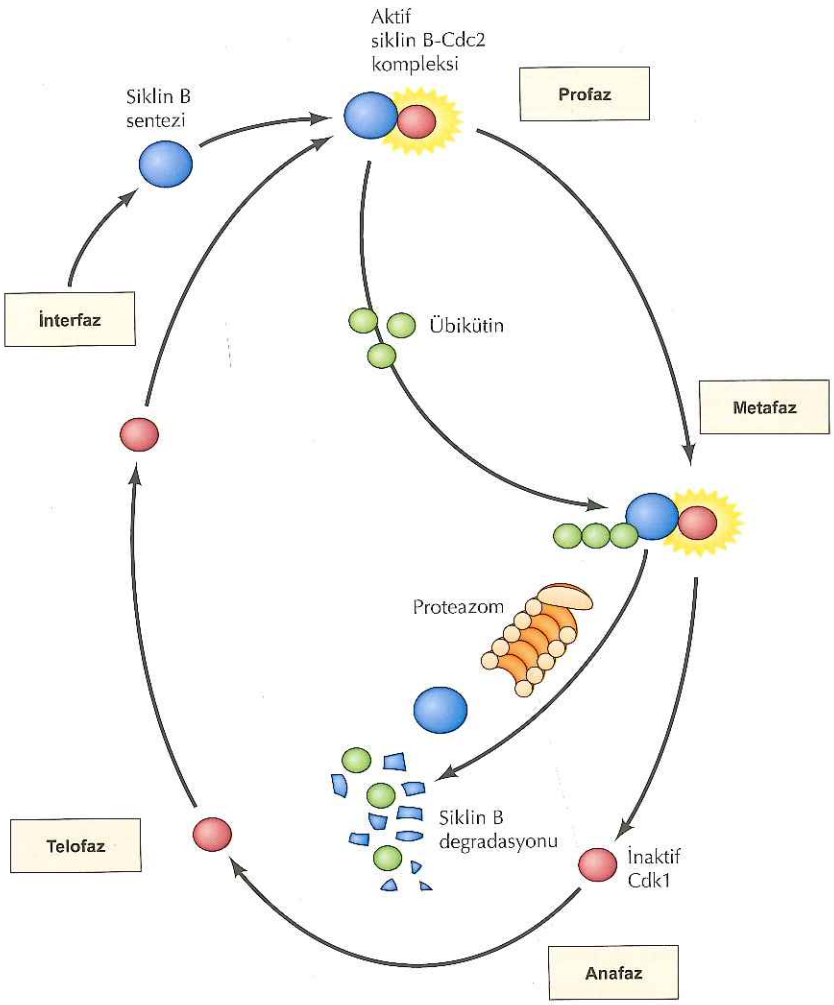
Bilgi İçin

Übikütin-Proteazom yolağı hücre sağ kalımı ve çoğalmasını kontrol eden proteinler dahil olmak üzere çok sayıda önemli regülatör proteinin yıkımından sorumludur. Kanser hücrelerinin çoğalmasının bu regülatör proteinlerin yıkımına bağlı olduğunun öğrenilmesinden bu yana proteozom anti-kanser ilaçlar için yeni bir hedef oluşturmuştur. Bortezomib bir insan kanseri olan "multiple myeloma" tedavisi için onaylanmış ilk proteozom inhibitörüdür. (Bkz. Bölüm 19)

Animasyon 9.2
sites.sinauer.com/cooper7e/a9.2
Übikütin–Proteazom Yolağı
Ökaryotik hücrelerde übikütin molekül zincirleri proteine eklenerek proteinlerin proteaz kompleksi tarafından hızlı yıkımı için işaretlenir.



Şekil 9.46 Übikütin-proteozom yolağı Proteinler hızlı yıkım için çoklu übikütin moleküllerinin kovalent bağlanması ile, bir poliübikütin zinciri oluşturacak şekilde işaretlenir. Bu süreç bazı übikütin ligazlar (E3' ler) tarafından düzenlenir. Poliübikütinlenen proteinler bir proteaz kompleksi (proteozom) tarafından degrade edilir.



Şekil 9.47 Hücre döngüsü sırasında siklin degradasyonu Ökaryotik hücrelerde bölünme döngüsünün ilerlemesi kısmen Cdk1 protein kinazın düzenleyici alt ünitesi olan siklin B'nin sentezi ve degradasyonu ile kontrol edilir. İnterfaz sırasında siklin B'nin sentezi, aktif siklin B-Cdk1 kompleksinin oluşumuna neden olur, bu da mitoza girişi uyarır. Siklin B'nin proteozom tarafından hızla yıkılması, Cdk1 kinazın inaktivasyonuna neden olur, bu da hücrenin mitozdan çıkması ve bir sonraki hücre döngüsünün interfazına dönmesini sağlar.

B'deki yıkım kutusu adı verilen 9-amino asitlik bir dizi hedeflenir. Bu dizideki mutasyonlar siklin B yıkımını engeller ve bölünen hücreyi mitozda durdurarak, kontrollü protein yıkımının, hücre bölünmesi gibi esasi bir hücresel süreç için ne derece önemli olduğunu gösterir.

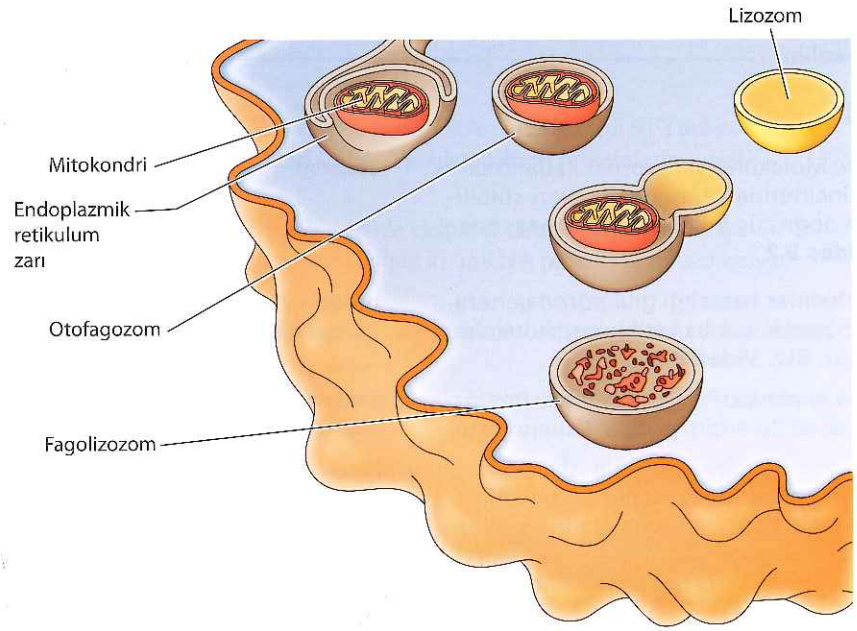
Lizozomal proteoliz

Ökaryot hücrelerde diğer bir majör protein yıkım yolu proteinlerin **lizozomlar** tarafından alınması ile gerçekleşir. Lizozomlar, çeşitli proteazların da dahil olduğu bir seri sindirim enzimlerini içeren, zarla çevrili organellerdir (bkz. Bölüm 11). Sitozolik proteinler ve sitoplazmik organellerin yıkılması ve

endositozla alınan hücre dışı proteinlerin sindirimi de dahil olmak üzere, hücre metabolizmasında çeşitli rolleri vardır.

Proteazlar ve diğer sindirim enzimlerinin lizozomda tutulması hücre bileşenlerinin kontrolsuz bir şekilde yıkımını önler. Bu nedenle, lizozomal proteoliz ile yıkım için hücresel proteinlerin önce lizozomlar tarafından alınması gerekmektedir. Hücresel proteinlerin alımında ki başlıca yolak, **otofaji**'dir. Bu süreç büyük olasılıkla endoplazmik retikulum zarından çıkan, bir miktar sitoplazma ve sitoplazmik organel içeren veziküllerin (otofagozomlar) oluşumunu gerektirir (**Şekil 9.48**). Bu veziküller daha sonra lizozomlarla birleşir ve içindekiler lizozomal enzimler tarafından sindirilir. Otofagozomlara proteinlerin alımı seçici değildir, bu durum uzun ömürlü sitoplazmik proteinlerin yavaşça yıkılması ile sonuçlanır. Hücre proteinlerinin saatte yaklaşık % 1'i bu mekanizma ile yıkılmaktadır. Ek olarak mitokondri gibi bazı hasarlı organeller –çoğunda Übikütinler ile işaretlenme sonucunda– seçici olarak otofaji ile yıkıma hedeflenirler.

Otofaji çok hücreli organizmaların gelişimi sırasında ve besin maddelerinin varlığına cevap olarak düzenlenmektedir. Otofaji genellikle açlık sırasında aktive olmaktadır, böylece hücre gerekli olmayan protein ve organelleri yıkarak onların bileşenlerini tekrar tekrar kullanıma sokar. Ek olarak otofaji, yeniden doku şekillenmesi ve hücresel bileşenlerin yıkımını içeren böcek metamorfozu gibi, birçok gelişim süreçte de önemli rol oynar. Bölüm 18'de tartışıldığı gibi, otofaji ayni zamanda programlı hücre ölümünde de önemli rol oynar ve otofaji hataları kanser ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 9.48 Otofaji Lizozomlar proteazlar dahil olmak üzere çok sayıda sindirim enzimi bulundururlar. Lizozomlar hücresel proteinleri, endoplazmik retikulumdan köken alan membranların, bulunduğu bölgedeki sitoplazma ve organelleri, (örn., bir mitokondri) çevrelemesi ile oluşan otofagozomlarla füzyon yaparak içeri alır. Bu füzyon sonucunda otofagozomların içeriklerini sindirecek olan bir fagolizozom oluşur.

ÖZET

mRNA'nın Translasyonu

- ***Taşıyıcı RNA'lar:*** Transfer RNA'lar amino asidlerin mRNA kalıbına dizilmesi için adaptör rolü oynar. Aminoaçil tRNA sentetazlar amino asidleri, daha sonra komplementer baz eşleşmesi ile mRNA kodonlarına bağlanacak olan uygun tRNA'lara aktarır.
- ***Ribozom:*** Ribozomlar, rRNA'lar ile proteinlerden oluşan iki alt birim içerir. 23S rRNA peptid bağı oluşumunu katalizleyen moleküldür.
- ***Mesajcı RNA'nın organizasyonu ve translasyonun başlaması:*** Prokaryot ve ökaryot mRNA'larının her ikisinin de translasyonu metiyonin ile başlar. Bakteride, başlama kodonunun önünde, mRNA'yı 16S rRNA ile baz eşleşmesi oluşturarak ribozoma yerleştiren dizi bulunur. Ökaryotlarda, başlama kodonu mRNA'nın 5'ucu taranarak belirlenir ve 7-metilguanozin kep tarafından tanınır.
- ***Translasyon süreci:*** Translasyon küçük ribozomal alt birimde mRNA ve metionil tRNA'nın bağlanması ile başlar. Daha sonra büyük ribozomal alt birim bu kompleks ile birleşir ve ribozom mRNA üzerinde ki sonlanma kodonuna erişinceye kadar polipeptid zinciri uzamaya devam eder. Hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda translasyonun başlaması, uzaması ve sonlanması için çok sayıda, ribozom dışı faktörlere gereksinim vardır. Bkz. **Animasyon 9.1** ve **Video 9.1**.
- ***Translasyonun düzenlenmesi:*** Spesifik mRNA'ların translasyonu, represör proteinlerin ve kodlamayan mikroRNA' ların bağlanması ile düzenlenebilir. Erken gelişim sırasında, mRNA'nın kontrollü poliadenilasyonu da translasyonun kontrolü için önemli bir mekanizmadır. Ek olarak hücrelerde genel translasyon aktivitesi başlangıç faktörlerinin modifikasyonu ile de kontrol edilir.

Protein Katlanması ve İşlenmesi

- ***Şaperonlar ve protein katlanması:*** Moleküler şaperonlar katlanmamış ve kısmen katlanmış polipeptid zincirlerine bağlanarak onları stabilize eder ve polipeptid zincirlerinin doğru üç boyutlu konformasyona katlanmasını kolaylaştırır. Bkz. **Video 9.2**.
- ***Protein katlanma hastalıkları:*** Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkları da içeren bir grup hastalık, yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonu sonucunda oluşur. Bkz. **Video 9.3**.
- ***Protein katlanmasını katalize eden enzimler:*** Protein disülfit izomeraz ve peptidil prolil izomeraz gibi en az iki tip enzim protein katlanmasını katalizlemektedir.
- ***Protein kesimi:*** Birçok proteinin işlenmesinde proteoliz önemli bir aşamadır. Örneğin, salgılanan ve çoğu ökaryot organellerine katılan proteinler, zarı polipeptid zincire olarak geçerken, proteolitik kesim ile uzaklaştırılan amino ucu sinyal dizileri ile varış noktalarına hedeflenirler.
- ***Glikozillenme:*** Birçok ökaryot protein, özellikle salgılanan ve zara plazma zarında yer alan proteinler, endoplazmik retikulum ve Golgi'de karbohidrat ilavesi ile modifiye olurlar.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

tRNA, antikodon, aminoaçil tRNA sentetaz

rRNA

proteine çevrilmeyen bölge (UTR), polisistronik, monosistronik , Shine-Dalgarno dizisi

başlatma faktörü, uzama faktörü, sonlandırma faktörü, polizom

RNA interferens (RNAi), kısa interferens RNA (siRNA), mikroRNA (miRNA)

şaperon

protein yanlış katlanma hastalığı, amiloid, prion

protein disülfid izomeraz (PDI), peptidil prolil izomeraz

proteoliz, sinyal dizi, sinyal peptidaz

glikozilasyon, glikoprotein, dolikol fosfat

ÖZET

- ***Lipidlerin takılması:*** Kovalent olarak bağlanan lipidler proteinleri genellikle plazma zarına yönlendirir ve yerleştirirler.

Protein Fonksiyonunun Düzenlenmesi

- ***Küçük moleküllerle düzenlenme:*** Birçok protein, amino asit ve nükleotid gibi bağlandığı zaman proteinin konformasyon ve aktivitesinde değişiklik oluşturan moleküllerle düzenlenir.
- ***Protein fosforillenmesi ve diğer modifikasyonlar:*** Birçok hücresel proteinin aktivitesini kontrol eden tersinir fosforilasyon protein kinazlar ve fosfatazlar tarafından sağlanır. Proteinler aynı zamanda diğer küçük molekül ve polipeptidlerin bağlanması ile de düzenlenir.
- ***Protein-protein etkileşimleri:*** Polipeptid zincirleri arasındaki etkileşim allosterik enzimler ve diğer hücresel proteinlerin düzenlenmesi için önemlidir.

Protein Yıkımı

- ***Übikütin-proteazom yolağı:*** Ökaryot hücrelerde seçici protein yıkımı için esas yol hedef proteinlerin proteazom tarafından hızlı proteolizi için poliübikütin zincirlerinin belirteç olarak kullanılmasıdır. Bkz. **Animasyon 9.2**
- ***Lizozomal proteoliz:*** Lizozomal proteazlar hücre dışı proteinleri endositozla içeri alıp yıkarlar ve sitoplazmik organeller ile, uzun ömürlü sitozolik proteinlerin yıkımından sorumludurlar. Otofaji hücre açlığına yanıt olarak aktive olur ve programlanmış hücre ölümünde önemli rol oynar.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

N-miristoillenme, prenillenme, palmitoillenme, glikolipid, glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapası

allosterik düzenlenme

protein kinaz, serin/treonin kinaz, tirozin kinaz, protein fosfataz, übikütin, SUMO

proteazom

lizozom, otofaji

Sorular

1. *E. coli* mRNA'larında 64 farklı kodon bulunur, bunların 61'i amino asit kodlar. Sadece 40 farklı tRNA'sı olan bakteri proteinlerini nasıl sentezleyebilir?
2. Klonlanmış bir cDNA'yı bakteride eksprese etmek istiyorsunuz. Bu diziye nasıl bir dizi ilave etmelisiniz ki, mRNA prokaryot ribozomunda okunabilsin?
3. Ribozomal RNA'nın ribozomda esas katalitik bileşen olduğunun kanıtlarını tartışınız.
4. Döllenmiş yumurtada poliadenilasyon inhibitörünün protein sentezine ne gibi etkisi olur?
5. Şaperonlar nedir? Isı şoku proteinlerinin sentezinde, hücrelerin yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmaları neden faydalıdır?
6. Karaciğer hücresi yüzeyinde exprese olan bir proteini çalışmakla ilgileniyorsunuz. Bu hücrelerin fosfolipaz ile (fosfolipidleri kesen bir enzim) muamelesi, bu proteinin bir transmembran protein mi yoksa hücre yüzeyine GPI aracılığı ile bağlanmış mı olduğunu tanımlamanızı nasıl sağlar?
7. Özgül proteinlerin übikütinlenmesi ve proteozom ile yıkılması için protein üzerinde özgül hedef dizilerin gerekli olduğunu gösteren ilk delil nedir ?
8. Bir proteinin übikütinlenmesi her zaman proteozomal yıkım için sinyal oluşturur mu ?

Atıf

Hücre
Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

9. miRNA'lar özgül mRNA'ların translasyonunu nasıl düzenler ?
10. mRNA'daki 3′ proteine çevrilmeyen bölgelerin işlevi nedir?
11. Düzenlenmiş proteolitik kesim neden bazı proteinlerin aktivitesi için önemlidir ?
12. Ribozom doğru amino açil tRNA'nın kodonun karşısına yerleşmesini nasıl sağlar ?
13. Pankretik hücrelerde ribonükleaz (RNaz) salınımından sorumlu yolağı kültür ortamına salınan RNaz aktivitesini ölçerek çalışıyorsunuz. Protein disülfit izomeraza (PDI) karşı siRNA ifade edilmesi sizin deneyinizde saptadığınız aktif RNaz miktarını nasıl etkiler ?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

(Her ana bölüm için en önemli anahtar derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

mRNA'nın Translasyonu

Aitken, C. E. and J. R. Lorsch. 2012. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Struc. Mol. Biol.* 19: 568-576. [R]

Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore and T. A. Steitz. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905-920. [P]

Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233. [R]

Ben-Shem, A., L. Jenner, G. Yusupova and M. Yusupov. 2010. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* 330: 1203-1209. [P]

Beringer, M. and M. V. Rodnina. 2007. The ribosomal peptidyl transferase. *Mol. Cell* 26: 311-321. [R]

Buxbaum, A. R., G. Haimovich and R. H. Singer. 2015. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 95-109. [R]

Crick, F. H. C. 1966. Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19: 548-555. [P]

Fabian, M. R. and N. Sonenberg. 2012. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature Struc. Mol. Biol.* 19: 586-593. [R]

Gebauer, F. and M. W. Hentze. 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 827-835. [R]

Holcik, M. and N. Sonenberg. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nature Rev. Cell Mol. Biol.* 6: 318-327. [R]

Holt, C. E. and S. L. Bullock. 2009. Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science* 326: 1212-1216. [R]

Ibba, M. and D. Soli. 2004. Aminoacylt RNAs: Setting the limits of the genetic code. *Genes Dev.* 18: 731-738. [R]

Jackson, R. J., C. U. T. Hellen and T.V. Pestova. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 113-127. [R]

Laursen, B. S., H. P. Sorensen, K. K. Mortensen and H. U. Sperling-Petersen. 2005. Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbial. Mol. Biol. Rev.* 69: 101-123. [R]

Martin, K. C. and A. Ephrussi. 2009. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* 136: 719-730. [R]

Nilsen, T. W. 2007. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet.* 23: 243-249. [R]

Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore and T. A. Steitz. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920-930. [P]

Noller, H. F., V. Hoffarth and L. Zimniak. 1992. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256: 1416-1419. [P]

Nomura, M. 1997. Reflections on the days of ribosome reconstitution research. *Trends Biochem. Sci.* 22: 275-279. [R]

Richter, J. D. 2007. CPEB: a life in translation. *Trends Biochem. Sci.* 32: 279-285. [R]

Richter, J. D. and N. Sonenberg. 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433: 477-480 . [R]

Sonenberg, N., and A. G. Hinnesbusch. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136: 731-745. [R]

Spriggs, K. A., M. Bushell and A. E. Willis. 2010. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol. Cell* 40: 228-237. [R]

Steitz, T. A. 2008. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 242- 253. [R]

Wu, L. and J. G. Belasco. 2008. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 29:1-7. [R]

Protein Katlanması ve İşlenmesi

Bulleid, N.J. and L. Ellgaard. 2011. Multiple ways to make disulfides. *Trends Biochem. Sci.* 36: 485-492.

[R]

Ellis, R. J. 2006. Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem. Sci.* 31: 395-401. [R]

Farazi, T. A., G. Waksman and J. I. Gordon. 2001. The biology and enzymology of protein *N*-myristoylation. *Ann. Rev. Biochem.* 276: 39501-39504. [R]

Hebert, D. N., S. C. Garman and M. Molinari. 2005. The glycan code of the endoplasmic reticulum: Asparagine-linked carbohydrates as protein maturation And quality-control tags. *Trends Cell Biol.* 15: 364-370. [R]

Helenius, A. and M. Aebi. 2004. Roles of *N*-linked glycans in the endoplasmicreticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 73: 1019-1049. [R]

Horwich, A. L., W. A. Fenton, E . Chapman and G. W. Farr. 2007. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 115-145. [R]

Iyer, S. P. N. and G. W. Hart. 2003. Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation: Enzymes of *O*-GlcNAc cycling. *Biochem.* 42: 2493-2499. [R]

Jonas, S. and E. Izaurralde. 2015. Towards a molecular understanding of microRNA mediated gene silencing. *Nature Rev. Genet.* 16: 421-433. [R]

Knowles, T. P. J., M. Vendruscolo and C. M. Dobson. 2014. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Rev. Mol . Cell Biol.* 15: 384-396. [R]

Mayer, M. P. 2010. Gymnastics of molecular chaperones. *Mol. Cell 39:* 321-331. [R]

Ohtsubo, K. and J. D. Marth. 2006. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease . *Cell* 126: 855-867. [R]

Paetzel, M., A. Karla, N. C. Strynadka and R. E. Dalbey. 2002. Signal peptidases. *Chem. Rev.* 102: 4549-4580. [R]

Prusiner, S. B. 1998. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13363-13383. [R]

Prusiner, S. B. 2013. Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Ann. Rev. Genet.* 47: 601-623. [R]

Selkoe, D. J. 2011. Alzheimer's disease. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3:a004457. [R]

Soto, C. 2012. Transmissible proteins: expanding the prion heresy. *Cell* 149: 968-977. [R]

Taipale, M., D. F. Jarosz and S. Lindquist. 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 515-528. [R]

Udenfriend, S. and K. Kodukula. 1995. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 563-591. [R]

Wilkinson, B. and H. F. Gilbert. 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* 1699: 35-44. [R]

Wright, L. P. and M. R. Philips. 2006. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J. Lipid Res.* 47: 883-891. [R]

Yan, A. and W. J. Lennarz. 2005. Unraveling the mechanism of protein *N*-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 280: 3121-3124. [R]

Yebenes, H., P. Mesa, I. G. Munoz, G. Montoya and J. M. Valpuesta. 2011. Chaperonins: two rings for folding. *Trends Biochem. Sci.* 36: 424-432. [R]

Young, J. C., V. R. Agashe, K. Siegers and F. U. Hartl. 2004. Pathways of chaperonemediated protein folding in the cytosol. *Nature Rev. Mol. Cell* Bioi. 5: 781-791. [R]

Protein Fonksiyonunun Düzenlenmesi

Alonso, A., J . Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon and T. Mustelin. 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117: 699-711. [R]

Barford, D. 1996. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 21: 407-412. [R]

Chen, Z. J. and L. J. Sun. 2009. Nonpro teolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol. Cell* 33: 275-286. [R]

Choudhary, C., B. T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin and M. Mann. 2014. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 536-550. [R]

Fauman, E. B. and M. A. Saper. 1996. Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Tiends Biochem. Sci.* 21: 413-417. [R]

Fischer, E. H. and E. G. Krebs. 1989. Commentary on "The phosphorylase β to α converting enzyme of rabbit skeletal muscle." *Biochim. Biophys. Acta* 1000: 297-301. [R]

Gareau, J. R. and C. D. Lima. 2010. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 861-871. [R]

Hanks, S. K., A. M. Quinn and T. Hunter. 1988. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52. [R]

Hess, D. T., A. Matsumoto, S.-O. Kim, H. E . Marshall and J. S. Stamler. 2005. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 150-166. [R]

Hochstrasser, M. 2009. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458: 422-429. [R]

Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236. [R]

Huse, M. and J. Kuriyan. 2002. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109: 275-282. [R]

Manning, G., G. D. Plowman, T. Hunter

and S. Sudarsanam. 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 27: 514-520. [R]

Marianayagarn, N .J., M. Sunde and J. M. Matthews. 2004. The power of two: Protein dimerization in biology. *Trends Biochem. Sci.* 29: 618-625. [R]

Milburn, M. V., L. Tong, A. M. DeVos, A. Brunger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura and S.-H. Kim. 1990. Molecular switch for signal transduction: Structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 247: 939-945. [P]

Monod, J. J.-P. Changeux and F. Jacob. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6: 306-329. [P]

Ulrich, H. D. and H. Walden. 2010. Ubiquitin signaling in DNA replication and repair. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 479-489. [R]

Vetter, I. R. and A. Wittinghofer. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294: 1299-1304. [R]

Protein Yıkımı

Bedford, L., S. Paine, P. W. Sheppard, R. J. Mayer and J. Roelofs. 2010. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol.* 20: 391-401. [R]

Boya, P., F. Reggiori and P. Codogno. 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biol.* 15: 713-720. [R]

Glotzer, M., A. W. Murray and M. W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132-138. [P]

Kleiger, G. and T. Mayor. 2014. Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends Cell Biol.* 24: 352-359. [R]

Mizushima, N. and B. Levine. 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biol.* 12: 823-830. [R]

Mizushima, N. and M. Komatsu. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147: 728-741. [R]

Pickart, C. M. and R. E. Cohen. 2004. Proteasomes and their kin: Proteases in the machine age. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 177-187. [R]

Reed, S. I. 2003. Ratchets and clocks: The cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 855-864. [R]

KISIM III

Hücre Yapısı ve İşlevi

Bölüm 10 **Nükleus**

Bölüm 11 **Protein Tasnifi ve Taşınması**

Bölüm 12 **Mitokondri, Kloroplastlar ve Peroksizomlar**

Bölüm 13 **Hücre İskeleti ve Hücre Hareketi**

Bölüm 14 **Plazma Zarı**

Bölüm 15 **Hücre Duvarları, Hücre Dışı Matriks ve Hücre Etkileşimleri**

BÖLÜM 10

Nükleus

Nükleer Zarf ve Nükleus ile Sitoplazma Arasındaki Trafik 367

Kromozomların Organizasyonu 381

Nükleer Cisimler 386

Moleküler Tıp
Nükleer Lamina Hastalıkları 371

Anahtar Deney
Nükleer Lokalizasyon Sinyallerinin Tanımlanması 374

Bir nükleusun varlığı, ökaryot hücreleri prokaryotlardan ayırt eden temel özelliktir. Genomu bulundurmasıyla nükleus, hem genetik bilgiye ulaşım yeri, hem de hücrenin kontrol merkezi işlevini üstlenir. DNA'nın replikasyonu, transkripsiyon, ve RNA işlenmesi nükleusta gerçekleşirken, sadece gen ekspresyonunun son aşaması (proteine çevrim ya da translasyon) sitoplazmada gerçekleşir.

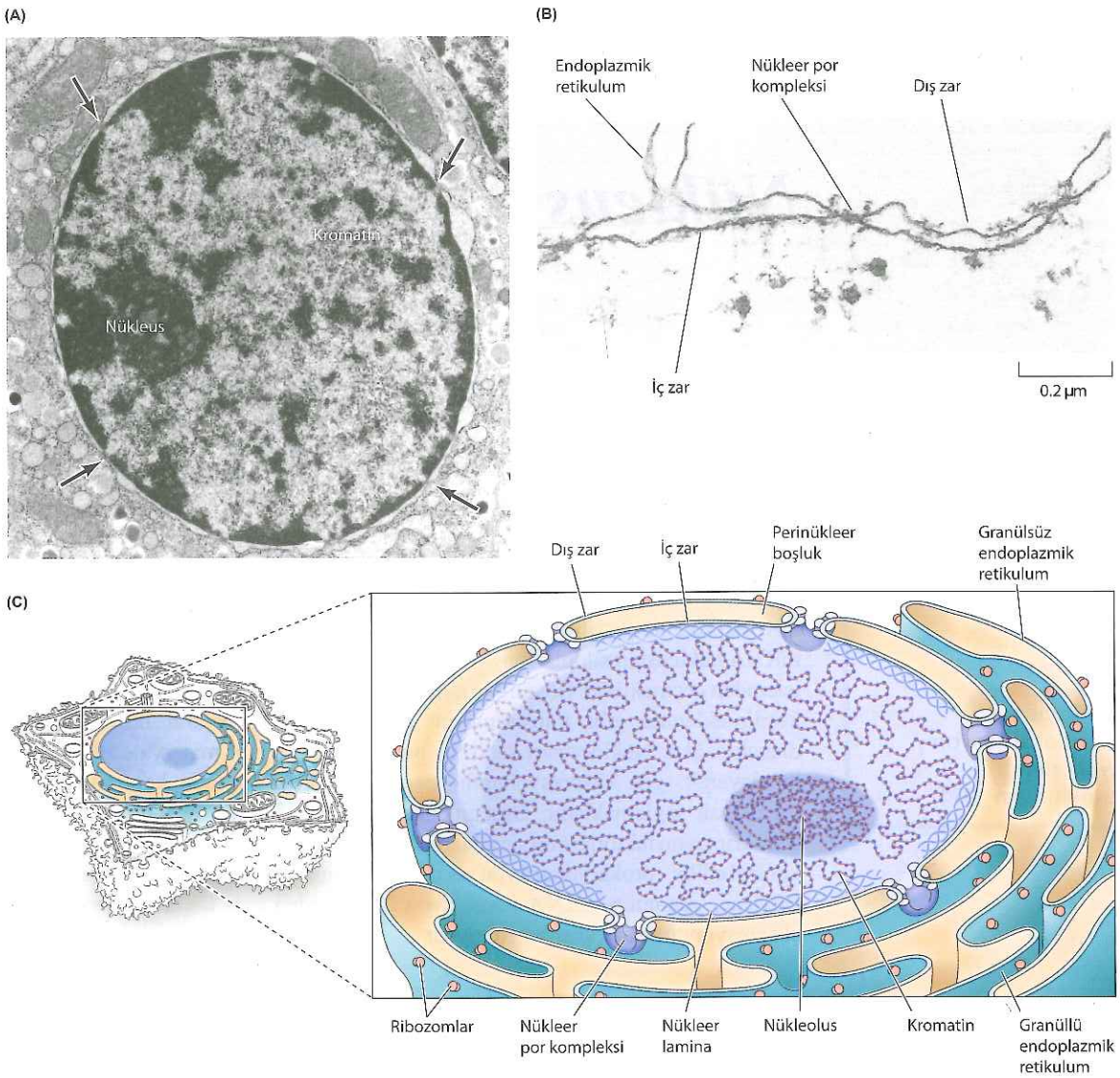
Nükleer zarf genomu sitoplazmadan ayırarak, sadece ökaryotlarda görülen bir mekanizmayla gen ekspresyonunun düzenlenmesini sağlar. Prokaryotlarda mRNA proteine çevrilirken transkripsiyonu da devam etmektedir, ökaryotlarda ise mRNA nükleustan sitoplazmaya aktarılmadan önce, transkripsiyon sonrası birçok işlemden geçmektedir. Böylelikle nükleusun varlığı, gen ekspresyonunun alternatif kesilip-eklenme gibi transkripsiyon sonrası mekanizmalarla düzenlenmesine olanak sağlar. Nükleer zarf seçilmiş proteinlerin genetik materyale ulaşmalarını kısıtlayarak, gen ekspresyonunun transkripsiyon düzeyinde kontrolünde yeni bir olanak sağlamaktadır. Örneğin, bazı ökaryot genlerin ekspresyonları, ilgili transkripsiyon faktörlerinin sitoplazmadan nükleusa taşınmasının düzenlenmesiyle kontrol edilir – prokaryotlarda bu şekilde transkripsiyon düzenlenmesi olanaksızdır. Böylece, genomun mRNA translasyon bölgesinden ayrı olması, ökaryotik gen ekspresyonunda merkezi bir rol oynar.

Nükleer Zarf ve Nükleus ile Sitoplazma Arasındaki Trafik

Nükleer zarf, nükleus içeriğini sitoplazmadan ayırır ve nukleusa yapısal bir çerçeve oluşturur. İki zarın oluşturduğu zarf, moleküllerin nükleus ve sitoplazma arasında serbest geçişini engeller ve böylece nükleusun farklı biyokimyasal bir bölme olarak kalmasını sağlar. Nükleer zarfta sadece nükleer por komplekslerince oluşturulan kanallardan, nükleus ile sitoplazma arasında düzenlenmiş bir moleküler geçişe olanak tanınır. Protein ve RNA'ların nükleer por komplekslerinden seçici taşınımı, sadece nükleusun iç yapısının oluşmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda ökaryotik gen ekspresyonunun düzenlenmesinde de kritik rol oynar.

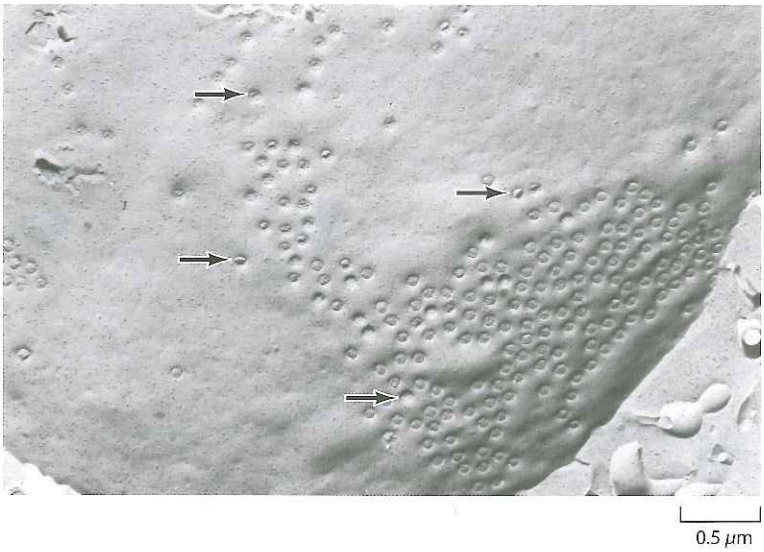
Nükleer zarfın yapısı

Nükleer zarf, iki nükleer zar, altlarında yer alan bir nükleer lamina ve nükleer por komplekslerinden oluşan, karmaşık bir yapıdır (**Şekil 10.1**). Nükleus, biri iç diğeri de dış **nükleer zar** olarak adlandırılan, ortak merkezli iki zar sistemiyle çevrelenmektedir. Dış nükleer zar endoplazmik retikulum zarı ile devam eder, bu da nükleus iç ve dış zarları arasındaki alanın, endoplazmik retikulum lümeniyle doğrudan ilişkisini sağlamaktadır. Dış nükleer zar işlevsel olarak endoplazmik



Şekil 10.1 Nükleer zarf (A) Bir nükleusun elektron mikroskoptaki görüntüsü. Dış ve iç nükleer zarlar nükleer por komplekslerinde birleşmektedir (oklar). (B) Dış nükleer zarın endoplazmik retikulumla devam ettiğinin görüldüğü bir elektron mikroskop görüntüsü. (C) Nükleer zarfın şeması. İç nükleer zar, kromatinin bağlanma bölgelerini oluşturan nükleer lamina ile kaplıdır. (B, Dr. Werner W. Franke'nin izni ile, Alman Kanser Araştırma Merkezi, Heidelberg)

retikulum zarlarına benzemekte (bkz. Bölüm 11) ve dış sitoplazmik yüzeyine ribozomlar bağlanmaktadır, ancak protein kompozisyonu biraz farklılık gösterir: hücre iskeletine bağlanan membran proteinleri yönünden zengin olmakla birlikte endoplazmik retikuluma tübüler şeklini veren proteinleri barındırmaz. Bu yapıya zıt olarak iç nükleer zarda, nükleer laminaya bağlanan proteinler gibi 60 farklı integral membran proteini yer alır (aşağıda tartışılmaktadır).



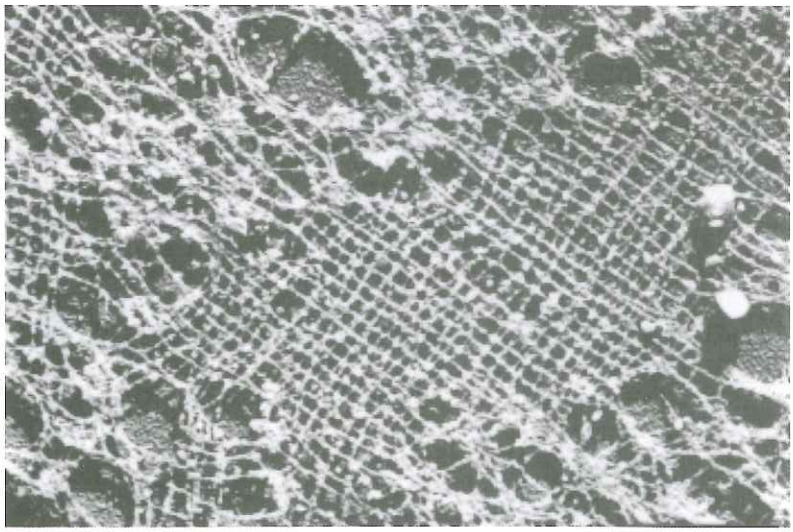
Şekil 10.2 Nükleer porları gösteren elektron mikroskop görüntüsü Nükleus zarının dondurulup çatlatılmasıyla elde edilen kesitlerde çok sayıda nükleer por (oklar) görülebilmektedir.

Nükleer zarların en kritik işlevi, nükleusun içeriğinin sitoplazmadan ayrılmasını sağlamak üzere, arada engel oluşturmasıdır. Diğer hücresel zarlar gibi her bir nükleer zar da çift tabakalı fosfolipid yapısında olup, sadece polar olmayan küçük moleküller için geçirgendirler (bkz. Şekil 2.36). Diğer moleküller çift tabakadan sızamazlar. İç ve dış çekirdek zarları nükleer por komplekslerinde birleşir. Küçük polar moleküller ile makro moleküllerin nükleer zarfı geçebildikleri yegane yerler bu por kompleksleridir (**Şekil 10.2**). Bir sonraki kısımda tartışılacağı gibi, nükleer por kompleksi, proteinlerin ve RNA'ların nükleusla sitoplazma arasındaki geliş-gidişlerini seçici olarak kontrol eden karmaşık bir yapıdır.

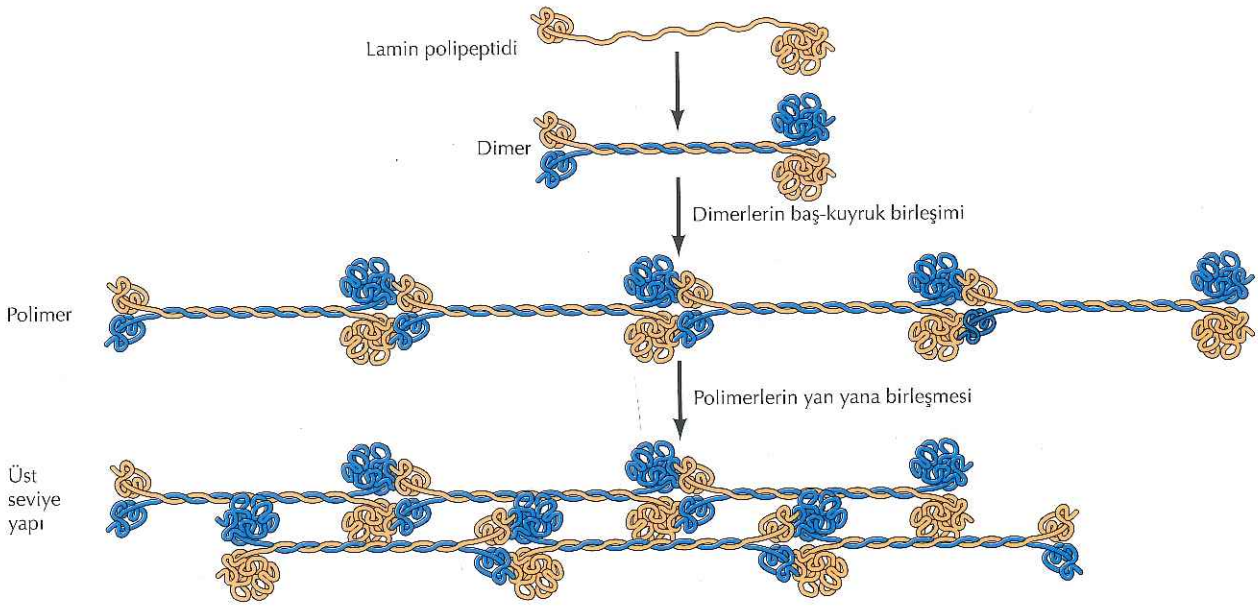
Bilgi İçin

Memelilerdeki eritrositler (ya da kırmızı kan hücreleri) nükleus içermezler. Eritrositler öncüllerinden gelişirken nükleus hücreden çıkarılır. (Bkz. Bölüm 18.)

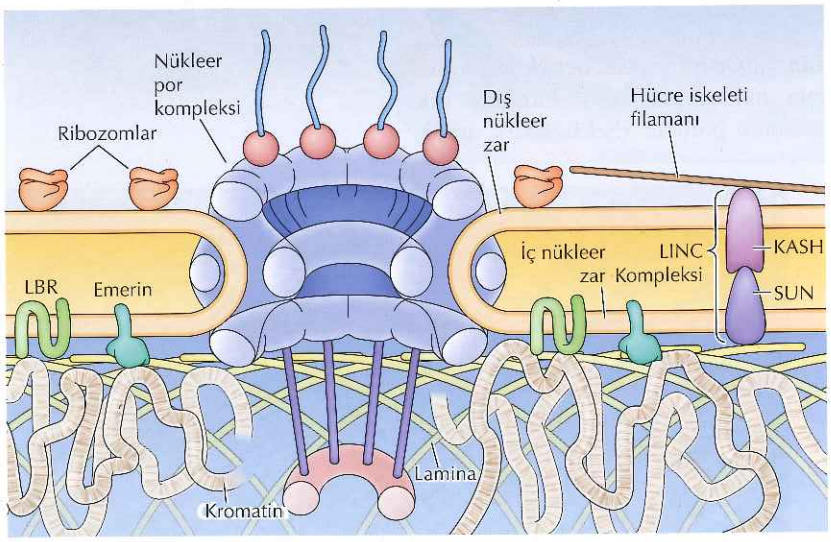
İç zarın altını kaplayan **nükleer lamina**, nükleusa yapısal destek sağlayan, ipliksi bir örgüdür. *Xenopus* oositlerinin nükleer laminası, birbirine dik uzanan iplikçiklerin belirgin bir örgüsü olarak görünür (**Şekil 10.3**), ancak somatik hücrelerin laminalarının da benzer bir yapıda olup olmadıkları bilinmemektedir. Nükleer lamina, **laminler** adı verilen 60-80 kilodaltonluk (kd) ipliksi proteinler ile bunlarla bağlantılı proteinlerden oluşmaktadır. Bitki hücreleri, laminlerden tamamen farklı proteinlerin oluşturduğu benzer bir ipliksi ağa sahiptirler. Laminler bir ara-filaman protein sınıfıdır; diğer



Şekil 10.3 Nükleer laminanın elektron mikroskop görüntüsü Nükleer lamina, ipliklerden oluşan eleksi yapısıyla çekirdek iç zarını alttan destekleyerek, nükleus içerisine yayılır. (U. Aebi, J. Cohn, L. Buhle ve L. Gerace, 1986. Nature 323: 560.' dan alıntı).



Şekil 10.4 Lamin yapılanma modeli İki polipeptid molekülünün, merkezi α-heliks bölgelerinde, birbirine sarılmasıyla lamin dimerleri (ikili) oluşur. Bundan sonraki yapı, dimerlerin baş kuyruk bağlantılarıyla doğrusal bir polimer oluşturmaları ve polimerlerin yan yana yerleşmesiyle ortaya çıkan filamanlardır.



Şekil 10.5 Nükleer lamina İç nükleer zarda emerin, lamin B reseptörü (LBR) ve SUN proteinleri gibi nükleer laminler ile etkileşen çok sayıda integral zar proteini yer alır. SUN proteinleri dış nükleer zardaki KASH proteinlerine bağlanarak, nükleer lamina ile hücre iskeletini birleştiren LINC kompleksini oluştururlar. Laminler ve iç nükleer zar proteinleri de, emerin ve lamin B reseptörünün kromatin-ilişkili proteinler ile etkileşimleri aracılığı ile kromatine bağlanırlar.

sınıflar hücre iskeletinde bulunurlar (bkz. Bölüm 13). Diğer ara-filaman proteinleri gibi, laminlerde birbirleri ile bir araya gelerek üst seviye yapılar oluştururlar (**Şekil 10.4**). Bu yapılanmanın ilk basamağı iki lamin polipeptid zincirinin α-heliks yapılı bölgelerinin, dolanmış-sarmal (*dolanmış sarmal*) olarak bilinen bir yapı oluşturmak üzere üst üste kıvrılması ile bir dimer oluşturmasıdır. Daha sonra, bu lamin dimerleri bir araya gelerek nükleer laminayı oluşturur.

Laminlerin iç nükleus zarına tutunmaları, translasyon sonrası lipid eklenmesini -özellikle C ucu sisteinin prenillenmesi- ile kolaylaştırılır (bkz. Şekil 9.36). Ayrıca laminler, emerin ve lamin B reseptörü gibi spesifik nükleer iç zar proteinlerine bağlanır ve iç ve dış nükleer zarlardan geçen protein kompleksleri (LINC) aracılığı ile doğrudan hücre iskeletine tutunurlar (**Şekil 10.5**). Nükleer lamina ayrıca, kromatin-etkileşimli

Nükleer Lamina Hastalıkları

Hastalık

Emery ve Fritz E. Dreifuss 1966'da X- kromozomuna bağlı yeni bir kas distrofisi tanımladılar. Hastalığın erken döneminde, etkilenen bireyde, dirsekler, boyun ve topuk sertleşir ve genellikle kalpte ileti engeli oluşur. Bu belirtiler 10 yaş civarında ortaya çıkar, topuklardaki Aşil tendonunun sertleşmesi nedeniyle parmak- yürüyüşü ve dirsekleri bükme zorluğu gelişir. Kalp sorunları 20 yaş civarında ortaya çıkar ve kalp atışını düzenleyen aygıt (pacemaker) gerekebilir. Omuz ve üst koldaki kaslarda giderek kayıp ve zayıflık gelişir aynı durum bacaklarda baldır kaslarında da görülür, fakat bu yavaş gelişir ve genellikle, ileri yaşlara kadar sorun oluşturmaz.

Araştırıcılar, hastalığın keşfinden yaklaşık 30 yıl sonra, bu X'e bağlı Emery-Dreifuss kas distrofisinin yeni bir transmembran proteindeki mutasyonlardan kaynaklandığını gösterdiler. Alan Emery'e ithafen proteine emerin adı verildi. Kısa sürede, birçok araştırma grubu, emerin'in iç nükleer zarda bulunan bir protein olduğunu ve X'e bağlı Emery-Dreifuss kas distrofisi hastalarında bulunmadığını gösterdiler. Bu beklenmedik bir şeydi: tüm hücrelerde sentezlenen bir nükleer zarf proteini dokuya özgül bir hastalık oluşturmaktaydı. Bütün vücut hücreleri bu proteinden yoksun olmasına karşın, hastalık sadece kaslarda ortaya çıkıyordu. Daha sonraki araştırıcılar, aynı bozukluğun cinsiyete bağlı olmadan da kalıtılabildiğini buldular. Cinsiyete bağlı olmayan bu Emery-Dreifuss kas distrofisi görülen ailelerde, nükleer lamin A ve C proteinlerini kodlayan tek gen olan *LMNA* geninde mutasyon bulundu. Sonuç olarak, biri nükleus iç zar proteinini kodlayan ve biri de temel nükleer lamini kodlayan iki gendeki mutasyonlar, klinik olarak birbirinin aynı kas distrofilerine yol açıyordu.

Daha da ilginci, yapılan benzer araştırmalarda. Dunnigan-tipi kısmi lipodistrofi ve Charcot-Marie-Tooth bozukluğu tip 2B1 gibi farklı hastalıklarda, *LMNA* geninde farklı mutasyonların izleri bulundu. Önceleri hekimler bu hastalıkları, kalıtım biçimleri ve kinik belirtilerine dayalı olarak değerlendirip farklı hastalıklar olarak sınıflandırdılar. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, diğer bir çekirdek iç zar proteini olan lamin B reseptörünün mutasyonlarının Pelger-Huet anomalisinin temel nedeni olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Moleküler ve Hücresel Temel

Biyologların çoğu, laminlerdeki mutasyonların nükleer yapıda genel bozukluklara ve hızlı bölünen hücrelerde ciddi sorunlara neden olacağını düşündüler. Bununla birlikte, hastalarda nükleus yapısında, sadece küçük değişikler görülür. Bu durumda asıl bilmece, nükleer laminler veya lamine bağlanan proteinlerdeki mutasyonların nasıl olup da dokuya özgül farklı hastalıkları oluşturduğudur. Yanıt henüz bilinmemekle birlikte, iki hipotez geliştirilmiştir. Birincisi "gen ekspresyonu" hipotezidir. Bu hipotez, iki lamin proteini olan A ve C'nin nükleer zarfla doğru etkileşiminin, dokuya özgü belli genlerin ekspresyonu için şart olduğunu ileri sürer. Transkripsiyonu yapılmayan genler tercihen nükleusun kenarlarına yerleşirken, hücre tipine göre ekspresyonu yapılan genler nükleusun merkezinde yoğunlaşmışlardır. Bu nedenle, bu hastalıkların temelini, hatalı protein etkileşimleri nedeniyle gelişen, gen ekspresyonu değişiklikleri oluşturmaktadır.

"Mekanik stres" hipotezinde, nükleer lamin-emerin kompleksindeki mutasyonun hücre içi iskelet sisteminin bütünlüğünü etkilediği düşünülmüştür. Bütün hücrelerde, lamina, iç nükleus zarı ve nükleer por kompleksleri birbirlerine sıkıca bağlıdır. Özellikle kas distrofileri için geçerli olan bu hipotez, nükleer por komplekslerine bağlı filamanlar aracılığıyla, laminanın kas hücresi hücre iskeletiyle dolaylı bağlantı kurabileceğini ileri sürer.

Önlem ve Tedavi

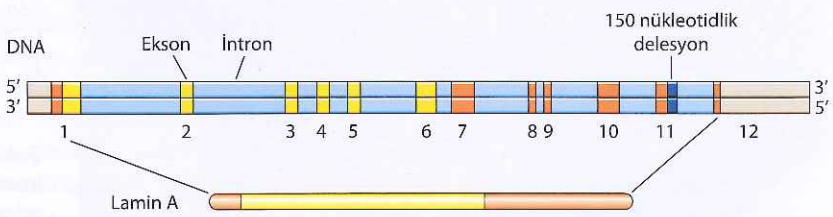
Nükleer lamina kompleksinde yer alan genel proteinlerdeki mutasyonların, farklı kalıtsal dokuya-özgü hastalıkların nedeni olarak saptanması, bilim insanlarını şaşırtmış ve nükleer zarfa bakış açılarının değişmesine yol açmıştır. Bu hastalıkların temelinde, mekanik bir düzenlemenin mi, yoksa gen ekspresyonunun mu olduğu konusunda daha ileri araştırmalara gereksinim vardır. Hastalıkların moleküler nedenlerinin bilinmesi, tanıyı kolaylaştırmakta ve bu yolla tedavilerine de imkan vermektedir. LMNA geninin işlev dışı bırakıldığı fare modellerindeki son gelişmeler, ilk basamağı oluşturuyor. Embriyolar geliştikçe, Emery-Dreifuss kas distrofisinin belirtileri görülmektedir. Sonuç olarak araştırıcılar, yavaş gelişen birçok konjenital hastalığın nükleer "laminopatilerin" yeni üyeleri olabileceğinin bilincindedirler.

Kaynaklar:

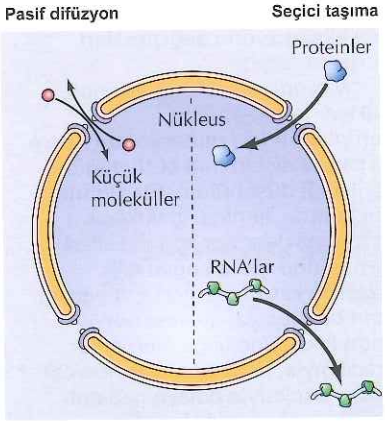
Davidson, P. M. and J. Lammerding. 2014. Broken nuclei-lamins, nuclear mechanics and disease. *Trends Cell Biol.* 24: 247-256.

(A)

(B)



(A) Hutchinson-Gilford progeria'lı bir çocuk. (B) LMNA geninin intron-ekson yapısını ve lamin A proteinini gösteren şema: lamin A geninin globüler bölgeleri kırmızı, çubuk (rod) bölgeleri sarı ile işaretlidir. Şekilde görülen mutant gen tarafından kodlanan mRNA, ekson 11'deki anormal kesilip-eklenme sonucu 150 baz-çifti uzunluğunda bir delesyona (koyu mavi) sahiptir. (A, Maggie Bartlett'un zniyle, Amerika Ulusal İnsan Genom Araştırma Enstitüsü.)



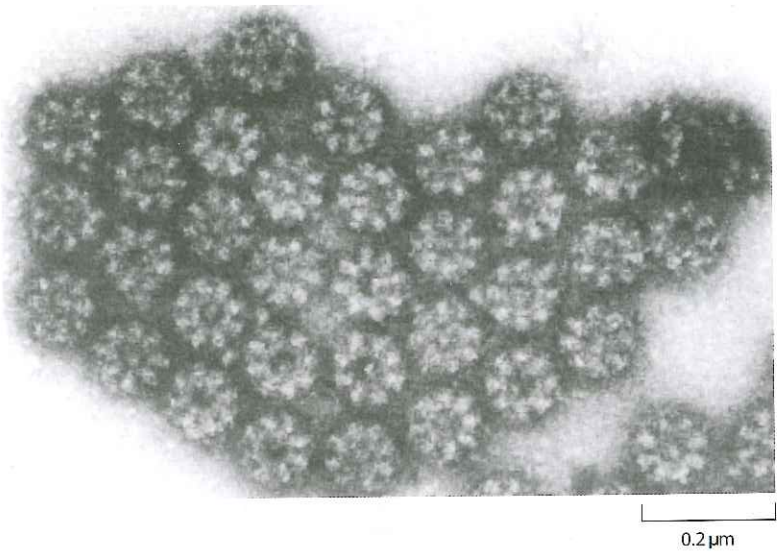
Şekil 10.6 Nükleer por komplekslerinden moleküler taşınım Küçük moleküller nükleer por komplekslerinden pasif difüzyonla kolayca geçerler. Bunun aksine, makromoleküller, özellikle proteinleri sitoplazmadan nükleusa ve RNA'ları nükleustan sitoplazmaya taşıyan, enerji bağımlı seçici bir taşıma ile aktarılırlar.

proteinlerin, emerin ve lamin B reseptörü ile etkileşimleri yolu ile kromatin ile bağlantılıdır. Bu bölümde daha sonra tartışılacağı gibi, kromatinin nükleer zarf ile etkileşimi, transkripsiyona uğramayan heterokromatinin, nükleusun periferine yerleşiminde önemli bir rol oynar.

Nükleer por kompleksi

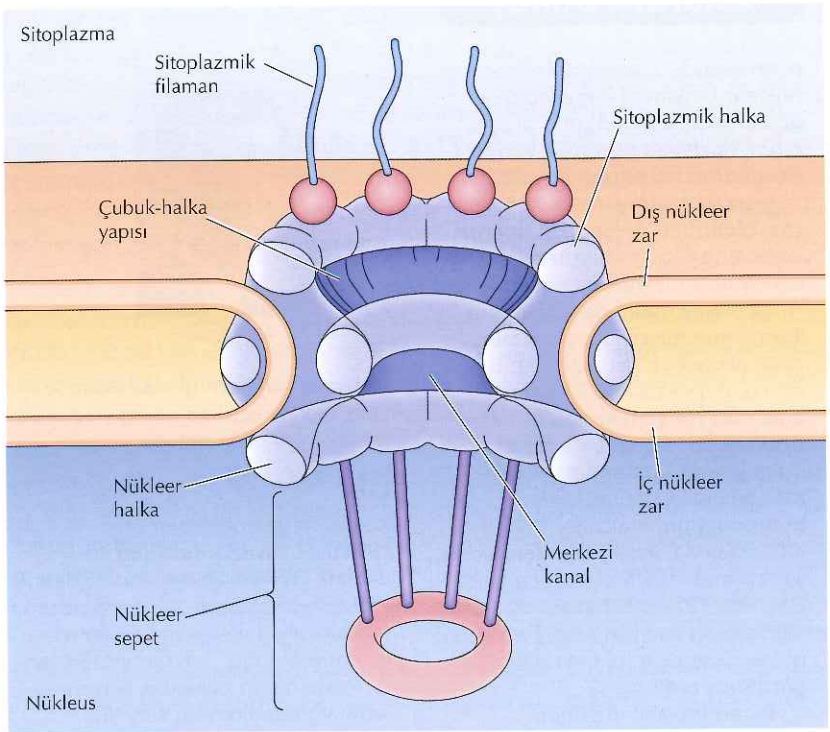
Nükleer por kompleksleri, küçük polar moleküllerin, iyonların ve makromolekülerin (proteinler ve RNA'lar) nükleus ile sitoplazma arasında dolaştığı yegane kanallardır. Nükleer por kompleksi 120 nm çapında, tahmini moleküler ağırlığı 125 milyon Dalton olan –ribozom büyüklüğünün 30 katı kadar– son derece büyük yapılardır. Omurgalılarda, nükleer por kompleksleri 30 farklı por proteininin (nükleoporinler olarak bilinen) çok sayıda kopyasından oluşmaktadır. Moleküllerin nükleusla sitoplazma arasında taşınmalarını denetleyen nükleer por kompleksleri, tüm ökaryot hücrelerin fizyolojilerinde temel bir rol oynarlar. RNA'ların, sentezlendikleri nükleustan, protein sentezindeki işlevlerini gerçekleştirecekleri sitoplazmaya, hızlı ve verimli şekilde gönderilmesi gerekir. Bunun aksi yönünde, nükleus işlevleri için gereksinim duyulan proteinler (örn., transkripsiyon faktörleri) sitoplazmada sentez edildikleri yerden nükleusa taşınmalıdırlar. Ayrıca, pek çok protein nükleus ve sitoplazma arasında her iki yönde de sürekli taşınırlar.

Moleküller, büyüklüklerine ve yapılarına bağlı olarak, nükleer por komplekslerinden iki farklı mekanizmayla geçerler (Şekil 10.6). Moleküler ağırlıkları yaklaşık 40 kd'nun altında olan bazı proteinler ve küçük moleküller, nükleer zarfı her iki yönde: sitoplazmadan çekirdeğe ya da çekirdekten sitoplazmaya serbestçe geçerler. Ancak, protein ve RNA moleküllerinin çoğu nükleer por komplekslerinden seçici bir taşıma işlemi sayesinde geçerler. Bu protein ve RNA'lar, nükleustan sitoplazmaya ya da sitoplazmadan nükleusa yönlendirilmelerini sağlayan spesifik sinyaller aracılığı ile tanınırlar.



Nükleer por komplekslerinin elektron mikroskopik görüntüleri, protein ve RNA'ların nükleer zarfı geçtikleri büyük merkezi bir kanalın etrafında yerleşmiş, sekizli simetrik bir yapıyı gösterir (Şekil 10.7). Bilgisayar-temelli görüntü analizi de dahil olmak üzere ayrıntılı yapısal

Şekil 10.7 Nükleer por komplekslerinin elektron mikroskopik görüntüsü Bu yüzeyden bakıldığında, izole nükleer por komplekslerinin, merkezi bir kanal etrafında simetrik yerleşimli sekiz yapısal alt birimli yapısı dikkat çekmektedir. (Dr. Ron Milligan'ın izniyle, Scripps. Araştırma Enstitüsü)



Şekil 10.8 Nükleer por kompleksi modeli Kompleks, nükleer zarfın sitoplazma ve nükleus tarafındaki halkalara tutunmuş sekiz çubuktan oluşur. Çubuk-halka yapısı merkezdeki kanalı çevreler. Sitoplazmik filamanlar sitoplazmik halkadan, nükleer sepeti oluşturan filamanlar ise nükleer halkadan çıkar.

analizler, nükleer por kompleksinin üç boyutlu modellerinin geliştirilmesine yol açtılar (Şekil 10.8). Bu çalışmalar, nükleer por komplekslerinin, merkezi bir kanal etrafında dizilmiş sekiz çubuğun birleşimiyle oluştuğunu gösterdi. Çubuklar nükleus ve sitoplazma yüzeyindeki halkalara tutunur ve bu çubuk-halka yapılanması, iç ve dış zarların birleşim yerlerinde nükleer zarfa yerleşir. Protein filamanlar sitoplazmik ve nükleer halkalar arasında uzanarak, nükleus tarafında sepete benzer bir yapı oluştururlar.

Proteinlerin nükleusa ve nükleusdan seçici taşınımı

Her dakika milyonlarca makromolekül nükleus ve sitoplazma arasında seçici olarak taşınmaktadır. Nükleer zarfdan seçici taşınımın temel ilkeleri, ilk olarak, sitoplazmadan nükleusa taşınan proteinlerin geçişlerinde anlaşılmıştır. Bu çeşit proteinler genom yapısı ve işlevlerinin her yönünden sorumludur. Bunlar histonları, DNA polimerazları, RNA polimerazları, transkripsiyon faktörlerini, kesilip-ekleme faktörlerini ve diğerlerini kapsamaktadır. Bu proteinler, **nükleer taşıyıcı reseptörler** tarafından tanınıp proteinin nükleer por kompleksinden geçmesini sağlayan, **nükleer yerleşim sinyalleri** olarak adlandırılan özgül amino asit dizileriyle nükleusa hedeflenirler.

Ayrıntılı haritası çıkartılan ilk nükleer yerleşim sinyali, Alan Smith ve arkadaşları tarafından 1984'de tanımlandı. Bu araştırıcılar, enfekte hücrede virüs tarafından kodlanan ve viral DNA'nın replikasyonunu başlatan, Simian virüs 40 (SV40) T antijenini incelediler (bkz. Bölüm 7). Bir replikasyon

Bilgi İçin

Pek çok virüs, çoğalabilmek için nükleusa girmek zorundadır. Hücrenin enfeksiyonu sonrası, HIV gibi retrovirüsler sitoplazmada genomik RNA'larını tersine transkripsiyonla proviral DNA'ya çevirirler. HIV evrimleşerek, proviral DNA'sının nükleusa taşınabilmesini sağlayan özel mekanizmalar geliştirmiştir, böylece DNA'sının transkripsiyonunu sağlar. (Bkz. Bölüm 4.)

Video 10.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v10.1
Nükleer Por Kompleksi
Nükleer por kompleksi, merkezi bir kanalı çevreleyen halkalara tutunan parmakların bir araya gelerek oluşturduğu bir yapıdır.

Animasyon 10.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a10.1
Nükleusa ve Dışına Taşınım
Proteinler nükleusa ya da nükleus dışına, nükleer por kompleksi ile taşınmalarına aracılık eden reseptörlerce tanınmalarını sağlayan, nükleer yerleşim sinyalleri ya da nükleustan çıkış sinyalleri sayesinde girip çıkabilirler.

Anahtar Deney

Nükleer Lokalizasyon Sinyallerinin Tanımlanması

A Short Amino Acid Sequence Able to Specify Nuclear Location

Daniel Kalderon, Bruce L. Roberts, William D. Richardson and Alan E. Smith

National Institute for Medical Research, Mill Hill, London

Cell, Volume 39, 1984, pages 499-509

Bağlam

Nükleusun, farklı biyokimyasal yapıda bir bölme durumunu koruması, proteinleri sitoplazma ile çekirdek arasında dağıtan bir mekanizma gerektirir. 1970'lerde yapılan çalışmalar, küçük moleküllerin nükleer zarfı difüzyonla kolaylıkla geçtiğini, ancak proteinlerin bunu yapamadığını gösterdi. Bu gözlem, nükleer proteinlerin, sitoplazmik ribozomlar üzerinde sentezlendikleri yerden nükleusa, özel olarak tanınıp seçilerek taşınmaları ile açıklanabilirdi.

Günter Blobel ve arkadaşlarının daha önceki çalışmaları, proteinlerin endoplazmik retikuluma, kısa amino asit dizisinden oluşan sinyal dizileriyle hedeflendiklerini ortaya çıkartmıştı (bkz. Bölüm 11). Alan Smith ve arkadaşları 1984'deki bu yayınlarında, bu kuralı, nükleer proteinlerin nükleer yerleşim sinyali olarak iş gören kısa bir amino asit dizisini tanımlayarak geliştirdiler.

Deneyler

Bir viral protein olan SV40 T antijeni, hayvan hücrelerinde nükleer yerleşimi çalışmak için model olarak kullanıldı. T antijeni, 94-kd'luk bir protein olup, SV40 DNA'sının replikasyonu için gereklidir ve normal olarak SV40 ile enfekte hücrelerde nükleusta bulunur. Alan Smith'in laboratuvarında ve Janet Butel'in laboratuvarlarında daha önce gerçekleştirilen çalışmalar (Lanford and Butel, 1984, *Cell* 37: 801-813), Lys-128'de deThr veya Asn değişimine yol açan mutasyonun, maymun ve kemirgen hücrelerinde T antijeninin, normal nükleer birikimini engellediğini göstermişti. Bu mutant T antijeninin, nükleusa taşınmak yerine sitoplazmada kalması, Lys-128'in nükleer yerleşim sinyalinin bir parçası olduğunu gösterdi. Kalderon ve arkadaşları, bu hipotezi iki farklı deney sisteminde test ettiler.

İlk olarak, farklı delesyonların T antijenin hücre içi yerleşimini nasıl etkilediğini araştırdılar. Bir ile 126'ncı ya da 136 ile C ucu arasında yer alan amino asitleri uzaklaştıran delesyonlara sahip T antijen mutantlarının, normal şekilde nükleusta biriktikleri bulundu. Bunun aksine, 127 ile 132 arasında amino asit delesyonu içeren mutant sitoplazmada kaldı. Böylece, 127 ile 132 arasında yer alan amino asit dizisinin, T antijenin nükleer yerleşimini belirlediği görülmüş oldu.

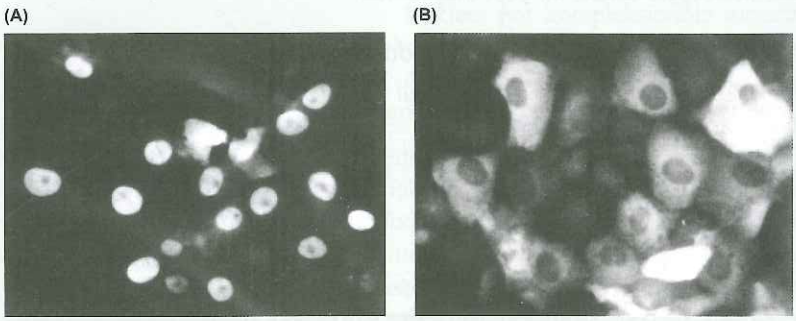
Bu amino asit dizisinin, diğer proteinleri de nükleusa yönlendirip yönlendirmeyeceğini belirlemek için, araştırmacılar normalde sitoplazmada bulunan proteinlere T antijeni amino asit dizisini yerleştirdiler. Bu deneyler, β-galaktozidaz veya piruvat kinaz proteinlerine, T antijeninin 126'dan 132'ye kadar olan amino asitlerinin eklenmesinin, normalde sitoplazmik olan bu moleküllerin nükleusta birikmesi için yeterli olduğunu gösterdi (şekle bakınız). SV40 T antijeninin bu kısa amino asit dizisi, proteinlerin nükleus içerisine

Alan Smith

alınması için hem gerekli hem de yeterli olan, nükleer yerleşim sinyali olarak işlev görmektedir.

Etki

Kalderon ve arkadaşlarının 1984'deki yayınlarında ileri sürdükleri, SV40 T antijeninin nükleer yerleşim sinyalinin "diğer nükleus proteinlerindeki benzer diziler için prototip olduğu" kavramı doğrulandı. Proteinlerin nükleusa alınmalarını yönlendiren bu sinyaller, nükleusun biyokimyasal kimliğinin oluşturulmasında ve ökaryotlarda sitoplazma ile nükleus arasındaki bölümlendirmenin sağlanmasında anahtar rol oynamaktadırlar. Günümüzde nükleer yerleşim sinyallerinin, sitoplazmik reseptörler tarafından tanındığı ve kendi substrat proteinlerinin nükleer por komplekslerine yönlendirilmelerinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle nükleer yerleşim sinyallerinin saptanması proteinlerin nükleusa alınma mekanizmalarını anlamada önemli bir gelişme sağladı.

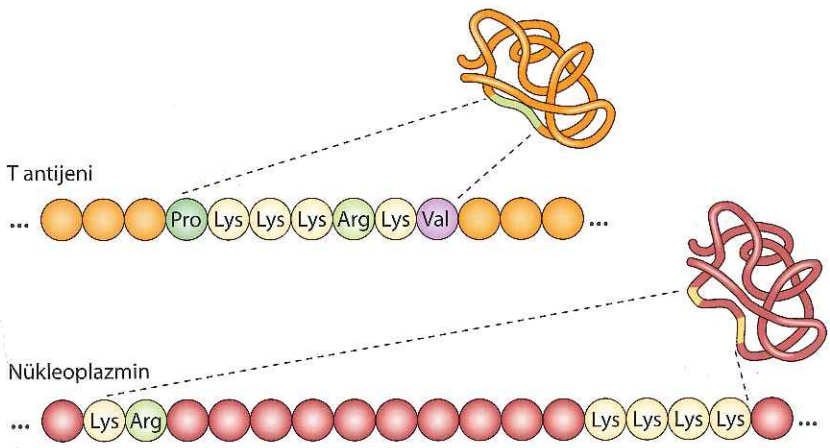


Hücreler, SV40 amino asitlerinin piruvat kinaz ile birleştiği kimerik proteinleri kodlayan plazmid DNA'ları ile mikroenjekte edildi. Daha sonra, bu bileşik proteinlerin hücredeki yerleşimleri immünfloresan mikroskopi ile belirlendi. (A) Bileşik protein SV40 nükleer yerleşim sinyaline (126'dan 132'ye amino asitleri) sahip. (B) Nükleer yerleşim sinyali, 131 ve 132. amino asitlerin delesyonu ile inaktive edildi.

proteininden beklendiği gibi, T antijeni normal olarak nükleusta bulunur. Bu proteinin yapısında yer alan tek bir lizindeki mutasyonun çekirdeğe taşınmasını engellediğinin ve T antijeninin sitoplazmada biriktiğinin gözlenmesiyle, ilk kez nükleus yerleşiminden sorumlu sinyal saptandı. Ardından yapılan çalışmalar, T antijeni nükleer yerleşim sinyalinin, Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val'den oluşan yedi amino asitlik yapısını belirledi. Bu dizinin, sadece T antijeninin taşınmasında gerekli olmayıp, normalde sitoplazmik olan proteinlere eklenmesinin bu proteinlerin çekirdekte birikmesi için yeterli olduğu bulundu.

Daha sonra, diğer birçok proteinde de nükleer yerleşim sinyalleri tanımlandı. Bu dizilerden bazıları, T antijenindeki gibi, bazik amino asitlerce (lizin ve arjinin) zengin kısa dizilerdir. Ancak, nükleer yerleşim sinyalini oluşturan amino asitler genellikle birbirlerine yakın olmakla birlikte, yan yana değildir. Örneğin, nükleoplazminin (kromatin yapılanmasında görevli bir protein) nükleer yerleşim sinyali iki parçadan oluşmaktadır: bir Lys-Arg çifti ve bundan 10 amino asit aşağıda bulunan dört lizin (**Şekil 10.9**). Lys-Arg ve Lys-Lys-Lys-Lys dizilerinin her ikisi de nükleusa hedeflenme için gereklidir, ancak bu iki yapı arasında yer alan on amino asitlik dizideki mutasyonlar, nükleusa yerleşimi etkilememektedir. Bu nükleer yerleşim sinyali, iki ayrı elemandan oluşması nedeniyle, iki parçalı (*bipartite*) olarak da adlandırılır. T antijeni ve nükleoplazmindeki gibi birçok nükleer yerleşim sinyali, sıklıkla "klasik" nükleer yerleşim sinyali olarak bilinen bu bazik amino asitleri içerir. Ayrıca bazı proteinler, farklı taşınım reseptörleri tarafından tanınan diğer nükleer yerleşim sinyallerine sahiptir.

Klasik nükleer yerleşim sinyaline sahip proteinler, proteinleri nükleer por kompleksi aracılığı ile nükleusa taşıdığı için **importin** olarak bilinen nükleer taşınım reseptörleri tarafından tanınırlar. İmportinler, bir GTP-bağlayan protein olan **Ran** ile birlikte işlev görür. Ran, nükleer pordan taşınımın yönünü düzenler. Ran, üç boyutlu yapısı ve aktivitesi, GTP bağlanması ve hidrolizi ile düzenlenen çok sayıda farklı küçük GTP-bağlayan proteinlerden biridir. Protein sentezinde rol oynayan translasyon faktörlerinin pek çoğu (bkz. Şekil 9.14 ve 9.21) ve Ras (bkz. Şekil 9.40) da dahil olmak üzere, GTP-bağlayan proteinlerin diğer örnekleri

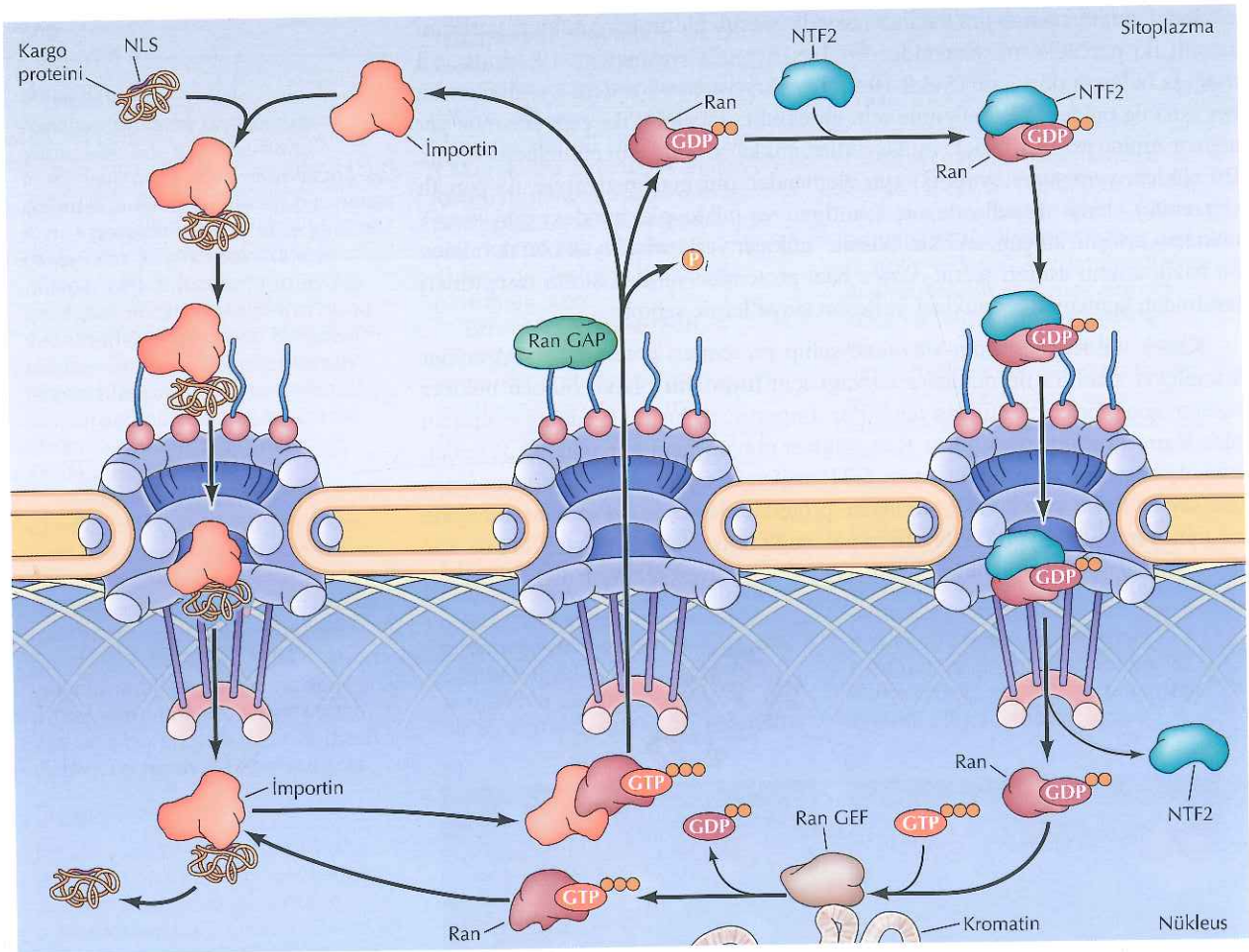


Şekil 10.9 Nükleer yerleşim sinyalleri T antijeni nükleer yerleşim sinyali, amino asitlerin bir tek doğrusal diziliminden oluşur. Bunun aksine, nükleoplazminin nükleer yerleşim sinyali, Lys-Arg dizini ve bunu izleyen, 10 amino asit daha aşağıda bulunan, Lys-Lys-Lys-Lys'den oluşan iki parçalı yapıdır.

Video 10.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v10.2
Nükleusun İçine Proteinler nükleer por kompleksinden seçici bir taşınım işlemi ile geçirilirler.

Bölüm 9'da tartışıldı. Bu proteinlerin üç boyutlu yapısı ve aktiviteleri, GTP ya da GDP bağlı olma durumuna göre düzenlenir. Ran örneğinde, GTP'nin GDP'ye hidrolizini uyaran enzimler, nükleer por kompleksinin sitoplazmik filamanlarına bağlı iken, GDP'nin GTP ile değişimini uyaran enzimler nükleustaki kromatine bağlanırlar. Bunun sonucunda, nükleustaki Ran/GTP konsantrasyonu yüksektir ve bu durum nükleer taşınımın yönü olduğunu belirler.

Nükleer taşınımın klasik döngüsü **Şekil 10.10**'da özetlenmiştir. Protein taşınımı bir importinin sitoplazmadaki taşınacak kargo proteinin nükleer yerleşim sinyaline bağlanması ile başlar. Bu kargo/importin kompleksi daha sonra, nükleer por kompleksinin sitoplazmik filamanlarındaki proteinlere



Şekil 10.10 Nükleusa, nükleer por kompleksi aracılı protein taşınımı Kargo proteinin nükleer yerleşim sinyalinin (NLS), bir importin tarafından tanınması ile nükleusa taşınma başlar. Kargo/importin kompleksi, sitoplazmik filamanlardaki nükleer por proteinlerine bağlanır ve pordan taşınır. Zarfın nükleus kısmında Ran/GTP'nin importine bağlanması ile kargo/importin kompleksi dağılır ve kargo proteini nükleusa salınır. İmportin-Ran/GTP kompleksi, nükleer por aracılığıyla yeniden nükleus dışına taşınır. Sitoplazmik filamanlardaki GTPaz-aktive edici protein (Ran GAP), Ran'a bağlı bulunan GTP'yi GDP'ye hidrolize ederek importini serbest bırakır. Ran/GDP daha sonra kendi nükleusa taşınım reseptörü olan NTF2 yardımı ile tekrar nükleusa geri taşınır. Nükleusta, Ran GEF (kromatine bağlı durumda) Ran'a bağlı bulunan GDP'nin GTP ile yer değiştirmesini sağlar, böylece Ran/GDP, Ran/GTP'ye dönüşür. Bu da, nükleus içindeki Ran/GTP konsantrasyonunun yüksek seviyede kalmasını sağlar.

bağlanır ve taşınım, importinlerin porun merkezi kanalını çevreleyen proteinler ile etkileşimi ile devam eder. Kargo/importin kompleksi zarfın nükleer kısmına ulaşınca, Ran/GTP importine bağlanır. Bu, importinin üç boyutlu yapısında değişime neden olarak kargo/importin kompleksinin dağılmasına yol açar. Böylece, kargo protein ayrılır ve nükleusa salınmış olur.

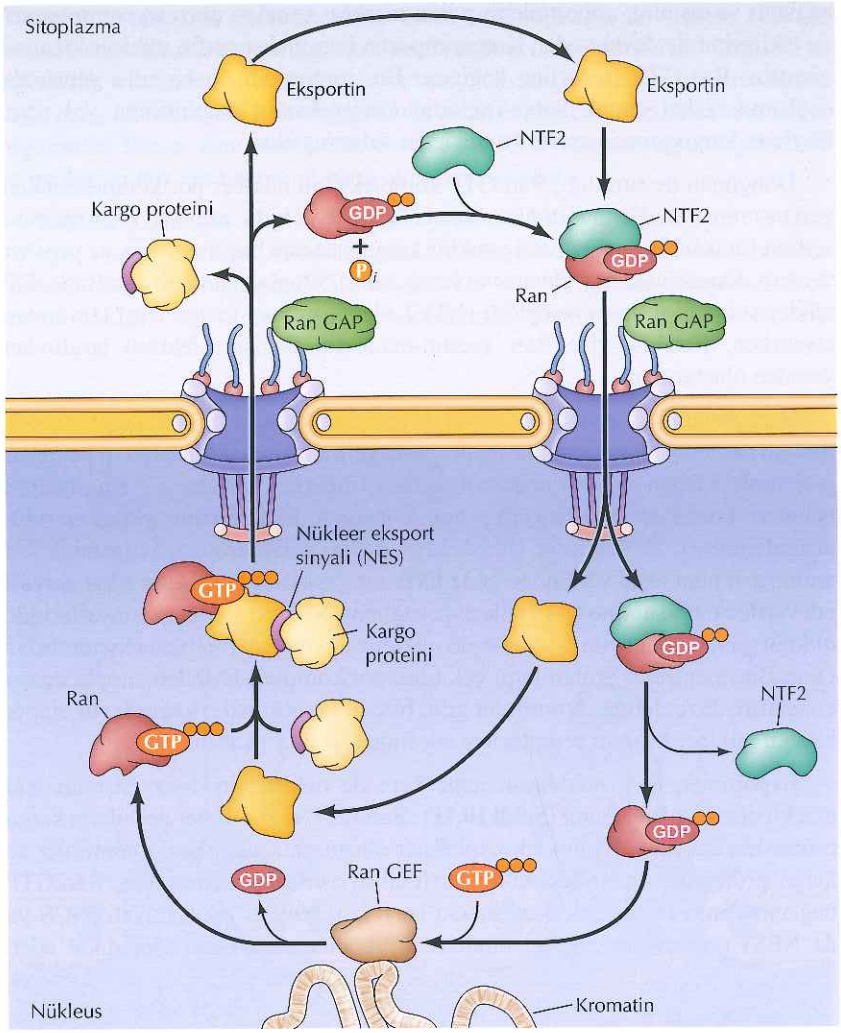
Döngünün devamlılığı, Ran/GTP kompleksinin nükleer por kompleksinden geri taşınımı ile sağlanır. Sitoplazmada GTP GDP'ye hidrolize olur. Bu, importini serbest bırakarak sitoplazmada yeni bir kargo proteine bağlanmasına ve yeni bir taşınım döngüsünde yer almasına olanak tanır. Sitoplazmada oluşan Ran/GDP nükleusa kendi taşınım reseptörü (NTF2 olarak bilinen bir protein) tarafından taşınırken, Ran/GTP ise Ran guanin-nükleotid değişim faktörü tarafından yeniden oluşturulur.

Bazı proteinler nükleusa alındıktan sonra orada kalırlarken, diğer bir çok protein nükleusla sitoplazma arasında gidip gelirler. Bunlardan bazıları RNA'lar gibi moleküllerin taşınımında rol alırken, diğerleri nükleer ve sitoplazmik işlevleri koordine ederler (örn., transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerinin düzenlenmesi). Proteinlerin çekirdekten dışarı gönderilmesi, hidrofobik bir amino asit olan lösin yönünden genellikle zengin olan ve **nükleer çıkış sinyali** adı verilen özgül amino asit dizileriyle sağlanır. Nükleer yerleşim sinyallerinde olduğu gibi, nükleer çıkış sinyallerini nükleustaki reseptörler olan **eksportinler** tanır. Bu reseptörler proteinlerin çekirdek por komplekslerinden sitoplazmaya çıkışlarını düzenlerler. İmportinler gibi, birçok eksportin de, **karyoferin** olarak bilinen nükleer taşınım reseptörleri ailesinin üyesidir (**Tablo 10.1**).

Exportinler, hem nükleusun içine hem de nükleustan dışarı taşınım için gerekli olan Ran'a bağlanır (**Şekil 10.11**). Ran/GTP, eksportinler ile onların kargo proteinleri arasında dayanıklı kompleksler oluşmasını sağlarken, importinler ve kargo proteinleri arasındaki komplekslerin ayrışmasına neden olur. Ran/GTP bağlanmasının eksportinler üzerindeki bu etkisi, nükleer çıkış sinyali (NÇS ya da NES) taşıyan proteinlerin nükleustan sitoplazmaya hareketini dikte eder.

Tablo 10.1 Karyoferinlere Örnekler

Karyoferin	Substratlar
Nükleusa taşınma (import)	
Importin (Kapα / Kapβ1 dimeri)	Bazik nükleer yerleşim sinyaline sahip proteinler (örn., nukleoplazmin)
Snurportin / Kapβ1	snRNP'ler (U1, U2, U4, U5)
Transportin / Kapβ2	mRNA bağlayıcı proteinler, ribozomal proteinler
İmportin7 / Kapβ1 dimer	Histon H1, ribozomal proteinler
Nükleustan taşınma (eksport)	
Crm1	Lösince-zengin nükleer yerleşim sinyaline sahip proteinler, snurportin, snRNA'lar, ribozomal altbirimler
CAS	Kapα
Eksportin-t	tRNA'lar
Eksportin5	miRNA'lar

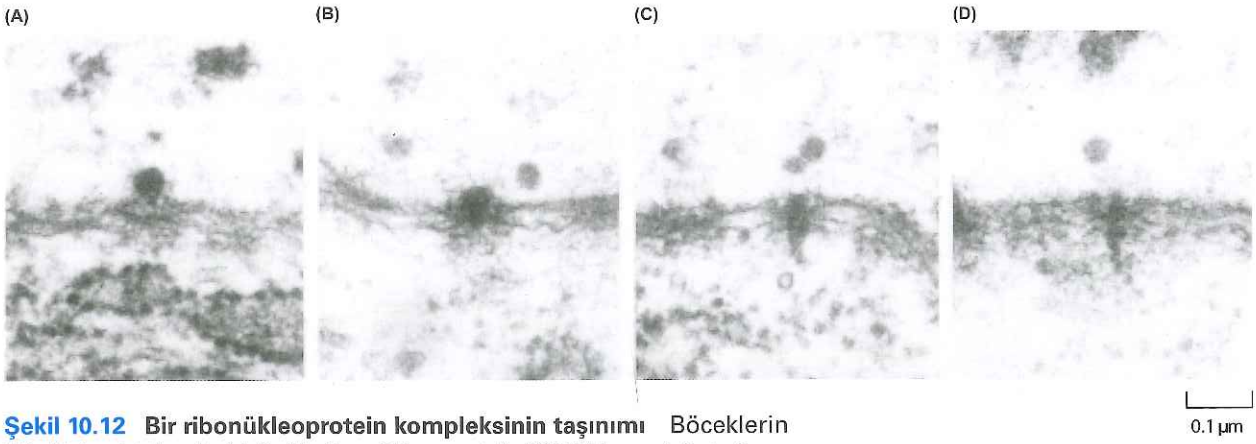


Şekil 10.11 Nükleustan çıkış Nükleer çıkış sinyali (NES) içeren kargo proteinleri ile eksportinler ve Ran/GTP arasındaki kompleksler nükleusta oluşur. Nükleer por komplekslerinden taşınımı takiben, Ran GAP Ran/GDP oluşturmak üzere, bağlı GTP'nin hidrolizini uyarır ve eksportinle taşınan protein sitoplazmaya serbest bırakılır. Ran/GDP ve eksportin daha sonra nükleusa geri gönderilirler. Ran/GTP, kromatine bağlı Ran GEF tarafından yeniden oluşturulur.

Böylece nükleusta Ran/GTP yardımı ile, eksportinler kargo proteinleri ile dayanıklı kompleksler kurarlar. Nükleer zarfın sitoplazmik tarafına taşınmasının ardından, GTP hidrolizi ve Ran/GDP'nin serbest kalması, kargo proteinin kompleksten ayrılmasına ve sitoplazmaya salıverilmesine yol açar. Daha sonra, eksportinler ve Ran/GDP nükleer por kompleksinden geçerek tekrar kullanılmak üzere geri dönüştürürler.

RNA'ların taşınması

Birçok proteinin sitoplazmadan nükleusa seçilerek taşınmasına karşın, protein sentezinde rol oynayan RNA'lar da nükleustan sitoplazmaya taşınır. RNA'lar

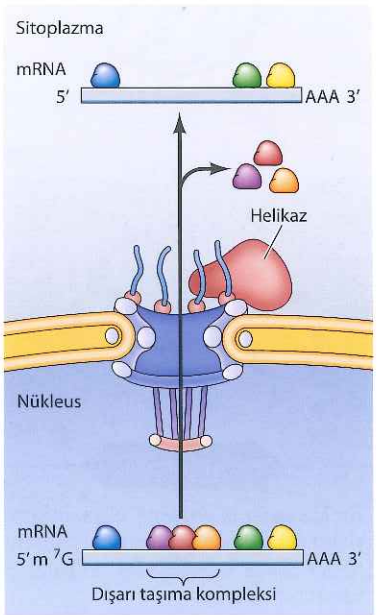


Şekil 10.12 Bir ribonükleoprotein kompleksinin taşınımı Böceklerin tükrük bezi hücreleri büyük ribonükleoprotein (RNP) kompleksleri oluştururlar, bu kompleksler 35–40 kb RNA içerirler ve toplam ağırlıkları 30 milyon dalton kadardır. Bu elektron mikroskop görüntü serisi, böyle bir RNP'nin nükleer por kompleksine tutunmasını (A) ve sitoplazmaya aktarılırken RNA'nın çözüldüğünü göstermektedir (B-D). (H. Mehlin et. al., 1992. *Cell* 69: 605'den alınmıştır.)

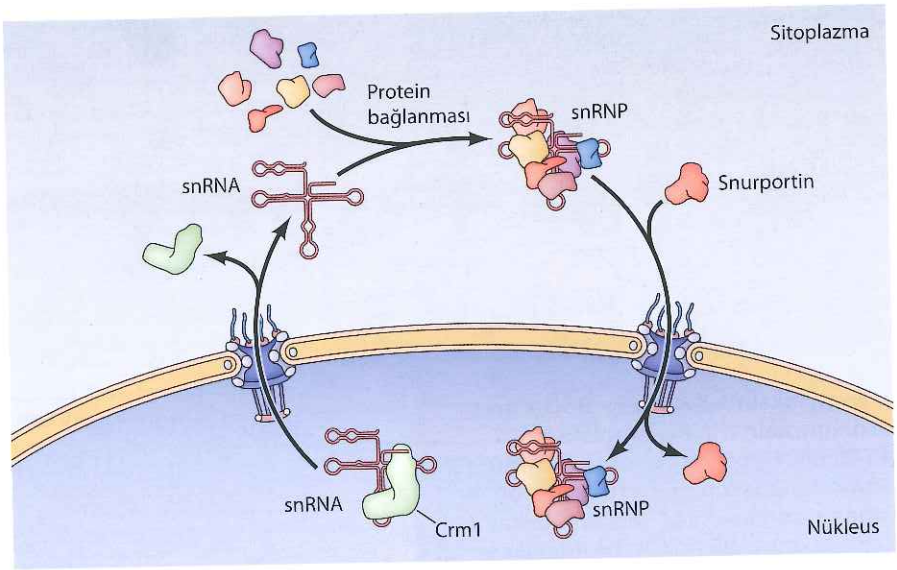
nükleer por kompleksinden ribonükleoprotein kompleksleri (RNP) olarak taşınır (Şekil 10.12). tRNA'lar, rRNA'lar ve miRNA'ların nükleus dışına taşınımları özgül karyoferin eksportinleri (bkz. Tablo 10.1) tarafından gerçekleştirilir (Şekil 10.11'de tarif edildiği gibi). tRNA'lar ve miRNA öncülleri nükleustan dışarı, RNA'lara doğrudan bağlanan, sırasıyla, eksportin-t ve eksportin5 tarafından taşınırlar. Ribozomal RNA'lar önce ribozomal proteinlerle nükleolusta birleşirler, yeni oluşan 60S ve 40S ribozomal alt birimler sitoplazmaya ayrı ayrı olarak Crm1 eksportini tarafından taşınır (bkz. Şekil 10.28). Nükleustan çıkışları, alt birim komplekslerinde yer alan proteinlerin nükleustan çıkış sinyalleriyle yönlendirilir.

mRNA'ların nükleus dışına taşınımları karyoferinler ve Ran'dan bağımsız, ayrı bir mekanizma aracılığı ile gerçekleşir (Şekil 10.13). Pre-mRNA'lar nükleusta işlenmeleri ve sitoplazmaya taşınımları sırasında en az 20 farklı protein ile etkileşirler. Bu proteinler arasında, kesilip-eklenmenin ve poliadenilasyonun tamamlanması ile uyumlu biçimde pre-mRNA'lara bağlanan farklı bir mRNA dışa-taşıyıcı (*exporter*) kompleks bulunur. Dışa-taşıyıcı kompleks daha sonra mRNA'ları nükleer porlardan dışarı taşır. Taşınımın yönü, nükleer por kompleksinin sitoplazmik yüzüne yerleşimli bir RNA helikaz tarafından belirlenir. Helikaz mRNA'yı yeniden modeller ve dışa-taşıyıcı kompleksi porun sitoplazmik tarafında mRNA'dan ayırır. Bu, mRNA'nın sitoplazmaya salıverilmesiyle sonuçlanır ve mRNA'nın nükleusa geri taşınımını engeller.

mRNA'ların aksine, sitoplazmada görevli miRNA'lar, tRNA'lar ve rRNA'lar, pre-mRNA kesilip-eklenmesinde rol oynayan snRNA'lar ve rRNA işlenmesinde rol oynayan snoRNA'lar (bu bölümde daha sonra tartışılacak) gibi pek çok kodlamayan RNA, nükleusta görev yaparlar. snoRNA'lar nükleusta kalırlar



Şekil 10.13 mRNA dışa-taşınımı İşlenmelerini takiben, mRNA'lar bir dışa-taşıyıcı komplekse bağlanırlar ve bu kompleks mRNA'ların nükleer por kompleksinden geçişlerini sağlar. Daha sonra, nükleer por kompleksinin sitoplazmik tarafı ile bir arada bulunan bir helikaz, mRNA'yı sitoplazmaya bırakır.



Şekil 10.14 snRNA'ların nükleus ve sitoplazma arasında taşınımı Küçük nükleer RNA' lar (snRNA' lar) ilk olarak Crm1 adlı bir eksportin tarafından nükleustan sitoplazmaya taşınırlar. Sitoplazmada, snRNA' lar proteinler ile bir araya gelerek snRNP' leri oluştururlar. Bu snRNP' ler de snurportin adlı bir importin tarafından tanınır ve nükleusa geri taşınırlar.

ancak snRNA'lar önce Crm1 adlı eksportin tarafından nükleustan sitoplazmaya taşınırlar (Şekil 10.14). Sitoplazmada snRNA'lar proteinler ile birleşerek snRNP'leri oluştururlar. Daha sonra, snRNP proteinlerindeki diziler snurportin adı verilen importin tarafından tanınır ve nükleusa geri taşınır.

Nükleer proteinlerin içeri girişlerinin (import) düzenlenmesi

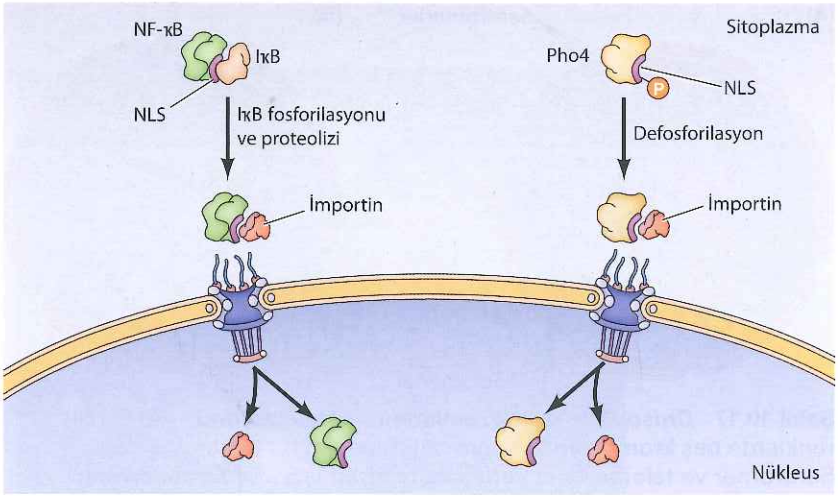
Proteinlerin nükleus içerisine aktarılması, nükleer proteinlerin aktivitelerinin kontrolünün sağlanmasında önemli bir kademedir. Örneğin transkripsiyon faktörleri, sadece nükleus içerisinde aktiftir, nükleusa alınmaları ve nükleustan çıkartılmalarının gen ekspresyonunun kontrolünde farklı bir anlamı vardır. Bölüm 16'da tartışılacağı gibi, transkripsiyon faktörleri ve protein kinazların nükleusa girişlerinin kontrolü, hücre yüzeyinden alınan sinyallerin nükleusa iletilmesini sağlayan bir mekanizma oluşturarak, hücre davranışlarının kontrolünde önemli bir rol oynar.

Bu düzenleme mekanizmasından birinde, transkripsiyon faktörleri (veya diğer proteinler) nükleer taşınım sinyallerini maskeleyen sitoplazmik proteinlerle birleşirler. Böyle bir durumda sinyaller algılanamaz hale geldiğinden bu proteinler sitoplazmada kalırlar. Memeli hücrelerinde çeşitli çevresel sinyallere yanıt olarak aktif duruma geçen transkripsiyon faktörü NF-κB bu duruma iyi bir örnektir (Şekil 10.15). Uyarılmamış hücrelerde NF-κB, inhibitör proteinle (IκB) aktif olmayan kompleks oluşturur ve sitoplazmada bulunur. IκB ile bağlanma NF-κB'nin nükleer yerleşim sinyalini maskeler ve NF-κB çekirdeğe taşınamaz. Uyarılan hücrelerde, IκB fosforillenir ve übikütin-aracılı proteolizle yıkılır (bkz. Şekil 9.46), bu durumda NF-κB çekirdeğe girerek hedef genlerde transkripsiyonu aktive eder.

Bilgi İçin

Bir Ebola virüs proteini, bir transkripsiyon faktörünün nükleusa taşınımını seçici olarak engelleyerek antiviral yanıtı bloke eder.

Diğer bazı transkripsiyon faktörlerinin nükleusa girişleri, inhibitör protein bağlanmasıyla değil, direkt olarak fosforilasyonla denetlenir (bkz. Şekil 10.15). Örneğin, maya transkripsiyon faktörü Pho4 sadece hücre yaşam döngüsünün belli bir basmağında nükleusa alınır. Onun dışında, nükleer yerleşim sinyaline bitişik serinin fosforillenmesiyle, nükleusa taşınması engellenir ve sitoplazmada



Şekil 10.15 Transkripsiyon faktörlerinin nükleusa girişlerinin düzenlenmesi Transkripsiyon faktörü NF-κB, nükleer yerleşim sinyalini (NLS) maskeleyen IκB ile inaktif kompleks oluşturarak sitoplazmada kalır. Hücre dışından uygun sinyal alındığında, IκB fosforillenir ve proteolizle yıkılır, böylece, NF–κB nükleusa taşınabilir. Maya transkripsiyon faktörü Pho4, nükleer yerleşim sinyalinin yakınından fosforillenerek sitoplazmada kalır. Fosfatın kontrollü uzaklaştırılması ile NLS açığa çıkar ve bu durumda Pho4 nükleusa taşınır.

kalır. Bununla birlikte uygun koşullar altında, bu bölgenin kontrollü defosforilasyonu , Pho4'ün nükleusa aktarımını ve aktivasyonunu sağlar.

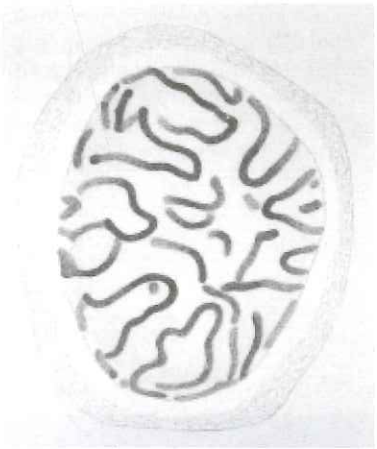
Kromozomların Organizasyonu

Kromatin, yavru nükleuslara dağıtılacak olan sıkıca paketlenmiş metafaz kromozomlarını oluşturmak üzere, mitoz sırasında yüksek düzeyde yoğunlaşır. İnterfaz sırasında, kromatinin bir kısmı (**heterokromatin**) yoğunluğunu korur ve transkripsiyon yönünden inaktiftir. Geri kalan kromatin bölgeleri (**ökromatin**) gevşektir ve çekirdek içerisinde her yöne yayılmış durumdadır. İnterfaz kromatini homojen bir şekilde dağılmış görülmesine karşın, kromozomlar nükleusta belirli bölgelere yerleşirler ve gen ekspresyonu kromozomal yerleşim ile paralellik gösterir. Ayrıca, DNA'nın anahtar aktiviteleri arasında yer alan replikasyon ve transkripsiyon nükleusta kümelenmiş bölgelerde gerçekleşir.

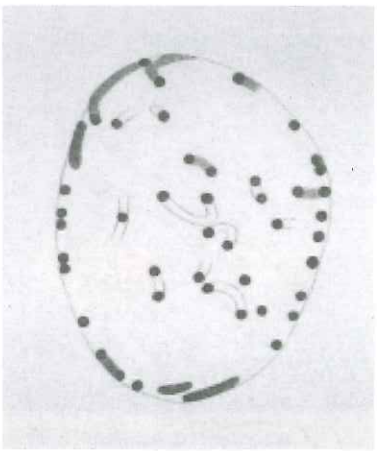
Kromozom bölgeleri

Kromatinin interfaz nükleusunda gelişigüzel dağılmadığı ilk kez, 1885'de Carl Rabl tarafından ileri sürüldü. Rabl, her bir kromozomun, nükleer zarfta zıt bölgelere tutunan sentromer ve telomerleriyle, kendilerine ait bir yer işgal ettiklerini ileri sürmüştür (Şekil 10.16). Kromozom organizasyonunun bu basit modeli yaklaşık yüz yıl sonra (1984'te) *Drosophila* tükürük bezlerindeki politen kromozomların ayrıntılı çalışılmasıyla doğrulanabilmiştir. Kromozomların

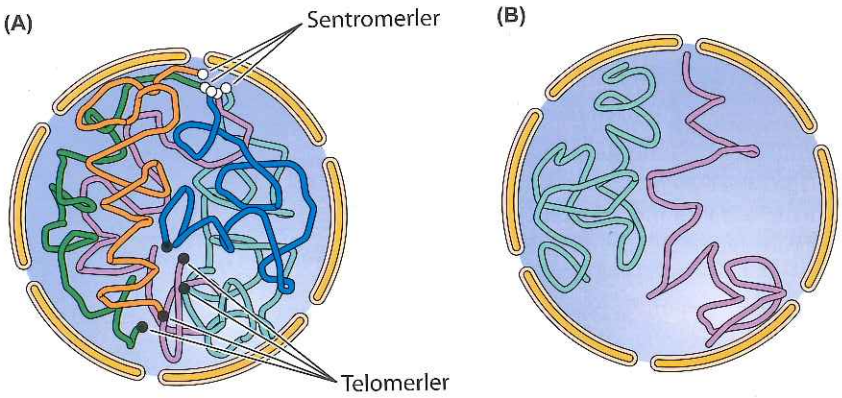
(A)



(B)



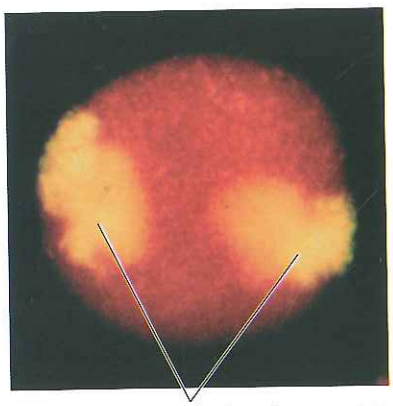
Şekil 10.16 Kromozom organizasyonu Semender hücrelerinde kromozomların el çizimi eskizinin kopyası. (A) Bütün kromozomlar. (B)Sadece telomerler (nükleus zarında yerleşimleri). (C. Rabl, 1885. *Morphologisches Jahrbuch* 10: 214' den alınmıştır.)



Şekil 10.17 *Drosophila* kromozomlarının organizasyonu (A) Farklı renklerde beş kromozom kolunun betimlendiği bir nükleus örneği. Sentromer ve telomerlerin yerleşimi belirtilmiştir. (B) Kromozomlar arasındaki topolojik ayrımı örneklemek üzere, kromozom 3'ün iki kolu gösterilmiştir. (D. Mathog et. al., 1984. *Nature* 308: 414' den alınmıştır.)

birbirlerinin etrafında gelişigüzel dolanmadıkları, her bir kromozomun nükleusun kromozom bölgeleri (*chromosome territory*) adı verilen farklı bir bölümünde yerleştiği gösterilmiştir (Şekil 10.17).

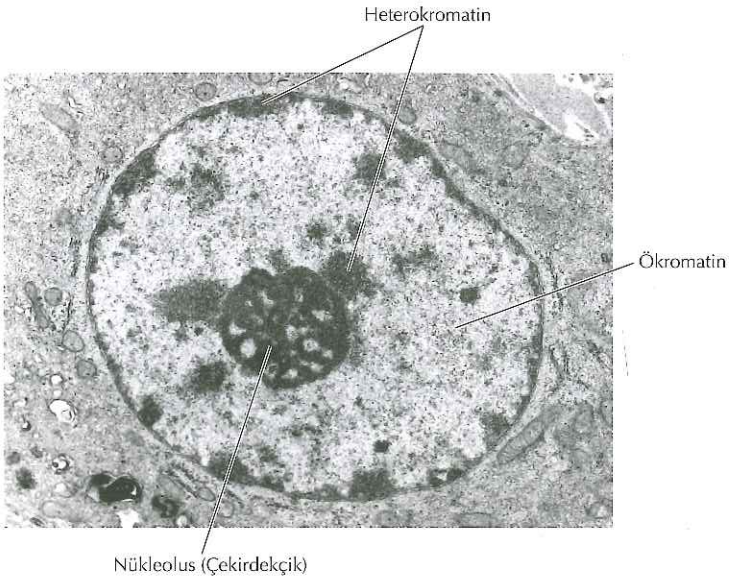
Yakın zaman önce gerçekleştirilen çalışmalar, nükleustaki kromozomların organizasyonunu birbirini tamamlayan iki farklı yaklaşımla incelemişlerdir. İlk olarak, her bir kromozomdaki tekrar dizilerine özgü floresan problar kullanılarak *in situ* hibridizasyon yöntemi ile kromozomların nükleus içindeki yerleşimleri görüntülenmiş ve böylece memeli hücrelerindeki nükleuslarda her bir kromozomun belirli bir bölgede yerleşmiş olduğu doğrulanmıştır (Şekil 10.18). İkinci olarak, canlı hücrelerde kromozomların birbirleri ile etkileşimleri kromozom konformasyon yakalama (3C) teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Bölüm 8'de tartışıldığı gibi, bu yöntemler etkileşen DNA dizilerini birbirlerine çapraz bağlayarak (*cross-link*) etkileşimler ile kromozomal bölgeler arasındaki etkileşimleri belirler. Bu bölgeler daha sonra çoğaltılabilir ve yüksek çıktılı dizileme ile tanımlanabilir. Kromozom organizasyonunun moleküler düzeyde 3C yöntemleri ile sağlanan global görünümleri, floresan *in situ* hybridization (FISH) ile elde edilmiş olan sonuçları doğrulamış ve daha ileri noktalara taşımıştır. 3C yöntemleri ile belirlenmiş etkileşimlerim çoğu, farklı kromozomlar arasında değil, aynı kromozomda yer alan bölgeler arasında gerçekleşmektedir. Bu gözlem, kromozomların nükleusta belirli bölgeleri işgal ettikleri görüşü ile uyum içindedir. Dahası, görünüşe göre sentromerler her bir kromozomu farklı bölümlere ayırmakta ve böylece bir kromozomun iki bacağı birbirleri ile etkileşmemektedir.


Kromozom 4'ün kopyaları

Kromatin lokalizasyonu ve transkripsiyonel aktivite

İnterfaz hücrelerindeki kromatinin çoğu (**ökromatin**) az yoğun (*decondensed*) ve transkripsiyonel olarak aktif durumda bulunur, ancak kromatinin bir kısmı

Şekil 10.18 Memeli nükleusundaki kromozomların organizasyonu Kromozom 4 üzerindeki tekrar dizilerine özgü floresan problar bir insan hücresi ile hibridize edilmiştir. Sarı floresan ile işaretlenen kromozom 4'ün iki kopyası nükleusta farklı bölgelerde bulunmaktadır. (A. I. Lamond ve W. C. Earnshaw, 1999. *Science* 280: 547 den alınmıştır.)



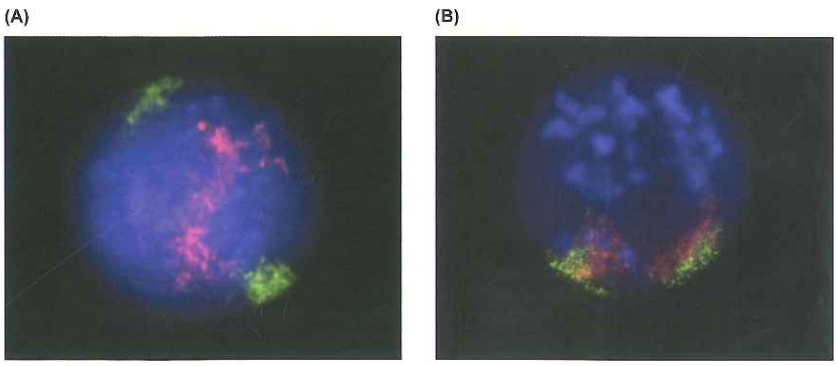
Şekil 10.19 İnterfaz nükleuslarındaki heterokromatin Ökromatin nükleusun içine dağılmıştır. Heterokromatin ise nükleer zarf ve nükleolus ile bağlantılıdır.

çok yoğun (*condensed*) halde bulunur (**heterokromatin**) ve transkripsiyona uğramaz. Heterokromatin, sentromer ve telomerlerdeki yüksek tekrarlı diziler gibi genellikle transkripsiyona uğramayan DNA dizilerini kapsar. Bunlara ek olarak, incelenen hücrede o sırada transkripsiyona uğramayan ancak diğer diferansiye hücre tiplerinde, farklı zamanlarda ya da hormonlar gibi farklı hücre dışı sinyallere yanıt olarak transkripsiyona uğrayan genler de heterokromatin yapıda bulunur. Kromozomal domainlerin transkripsiyonel aktivitesi nükleustaki yerleşimler ile ilişkilidir. Transkripsiyonel olarak inaktif olan heterokromatin sıklıkla nükleer zarf ya da nükleolusun çeperlerine yerleşimli olarak bulunurken, transkripsiyonel olarak aktif kromatin daha çok nükleusun iç kısımlarında bulunur (Şekil 10.19).

Bilgi İçin

Silli tek hücrelilerde iki tip nükleus bulunabilir: transkripsiyonel olarak aktif genlerin bulunduğu poliploid bir makronükleus ve özellikle eşeyli üremede rol oynayan, transkripsiyonel olarak aktif olmayan bir ya da daha çok diploid mikronükleuslar.

Kromatin yerleşiminin bu mikroskopik gözlemleri, transkripsiyonel olarak aktif ve inaktif kromatin bölgelerinin yerleşimlerinin kıyaslanarak daha ayrıntılı biçimde incelendiği çalışmalar ile desteklenmiştir. Örneğin, bazı insan kromozomları transkripsiyona uğrayan genler yönünden zenginken, diğer bazı kromozomlar az sayıda gen içerir. Bu farklı kromozomların kapladığı alanların kıyaslanması, gen-zengin kromozomların nükleusun merkezinde yer alırken gen-fakir kromozomların nükleusun çeperlerinde yer aldığını ortaya koymuştur (Şekil 10.20A). Ayrıca, aktif genlere özgü FISH probları ile yapılan çalışmalar, kromozomun transkripsiyona uğrayan bölgelerinin kromozomun geri kalanından uzaklaşarak nükleusun içine doğru uzandığını göstermiştir (Şekil 10.20B). Bu gözlem, aktif olarak transkripsiyona uğrayan genlerin



Şekil 10.20 Transkripsiyonel olarak aktif ve inaktif kromozomların floresan *in situ* hibridizasyonu (A) Gen-zengin kromozom 19 (kırmızı) ve gen-fakir kromozom 18 (yeşil)'e yönelik problar kullanarak floresan *in situ* hibridizasyon. (B) Fare kromozomu 2'nin tamamını (yeşil) ya da ekzon dizilerini (kırmızı) hedefleyen problar ile hibridizasyon. (W. A. Bickmore and B. van Steensel, 2013. *Cell* 152: 1270'den alınmıştır.)

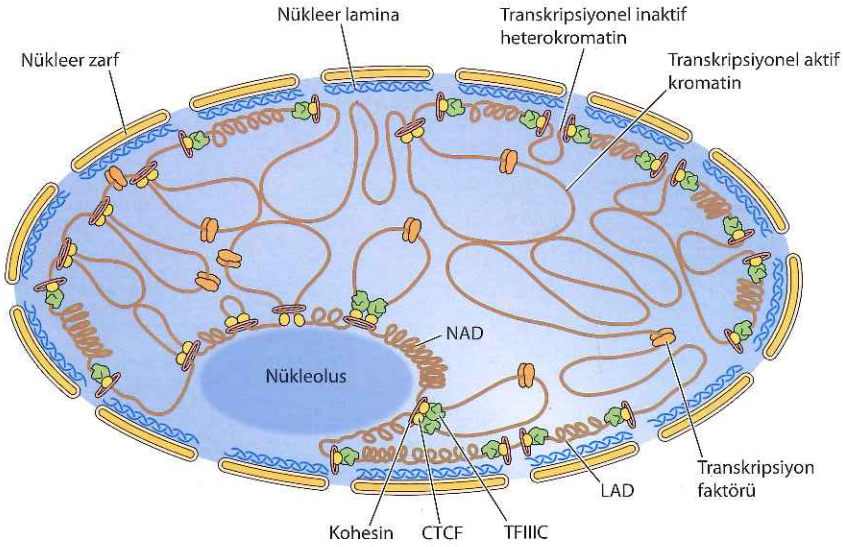
kromozomal bölgelerinden dışarı doğru ilmek oluşturduğuna ve belki de böylece transkripsiyon ya da RNA işlenmesini kolaylaştırdığına işaret etmektedir.

Kromozom konformasyon yakalama (3C) analizi, genomların birbiri ardına gelen topolojik olarak ilişkili bölgelere (TAD'lar) bölünmüş olduğunu, aynı bölgelerdeki noktaların birbirleri ile sıklıkla etkileştiğini ancak diğer bölgelerdeki noktalar ile nadiren etkileştiklerini göstermiştir (bkz. Şekil 8.20). İnsanlarda bu kromozom bölgeleri yaklaşık yüz bazdan yüz binlerce baza uzanabilmektedir. TAD'ların, promotorlar ile güçlendiricilerin etkileştiği bölgelerin yanı sıra, baskılanmış ve aktif kromatin ile ilişkili histon modifikasyonları ile karakterize kromozomal bölgelere de karşılık geldikleri düşünülmektedir. Bu kromozomal bölgelerin sınırları çok sayıda kohesin ve CTCF bağlanma dizileri içerir. CTCF'in, genom organizasyonunu düzenleyen şekillendirici bir protein olarak görev yaptığı düşünülmektedir.

Nükleusun çeperlerine yerleşimli kromatin bölgeleri, nükleer laminler ile bağlantılı DNA bölgelerinin izolasyonu için kullanılmış olan kromatin immünçöktürme de (bkz. Şekil 8.23) dahil olmak üzere çok sayıda farklı yöntem kullanılarak belirlenmiştir. İnsan hücrelerinde birbirleri ve nükleer lamina ile etkileşen yaklaşık 1000 ile 1500 arasında kromozomal bölge belirlenmiştir. Bu bögleler (**lamina-ile ilişkili bölgeler** ya da **LAD'lar** olarak bilinir) yaklaşık 10 kb ile 10.000 kb arasında olup toplam olarak insan genomunun %40 kadarını kapsarlar. Transkripsiyonel olarak inaktif heterokromatinin nükleer çeperlere yerleşimi ile uyumlu olarak, LAD'larda bulunan genler genellikle transkripsiyonel olarak baskılanmışlardır. Dikkat çekici olarak LAD'lar, histon modifikasyonları ile tanımlanan kromatin bölgeleri ve güçlendirici/promotor etkileşimlerini sınırlandıran topolojik olarak ilişkili bölgeler (TAD) ile paralellik göstermektedir. Buna göre, LAD'lar nükleer lamina ile ilişkili ve transkripsiyonel olarak inaktif heterokromatine karşılık gelmektedir. Kromatinin nükleer lamina ile etkileşiminin mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır ancak kromatinin, hem laminler hem de emerin ve lamin B reseptörü gibi iç nükleer membran proteinlerine bağlanması rol oynayabilir (bkz. Şekil 10.5). Heterokromatinin nükleer laminaya bağlanmasında rol oynayan etkileşimler arasında, lamin B reseptörünün heterokromatin proteini 1'e (HP1) bağlanması yer almaktadır. HP1, transkripsiyonel olarak inaktif kromatini işaretleyen metile olmuş H3-lizin-9 kalıntılarına bağlanır (bkz. Şekil 8.32). Benzer biçimde emerin, transkripsiyonel baskılanma ve kromatin yoğunlaşması ile ilişkili olan bir histon deasetilaz ile etkileşir.

Heterokromatinin nükleer laminaya yerleşimine ek olarak, nükleolus da heterokromatin ile çevrelenmiştir (bkz. Şekil 10.19). Nükleolus ile ilişkili olan kromatin bölgeleri (**nükleolus ile ilişkili bölgeler** ya da **NAD'lar**), izole edilmiş nükleoluslara bağlanmış DNA'nın dizilenmesi ile belirlenmişlerdir. İlginçtir ki, NAD'larda bulunan DNA dizileri LAD'lardakiler ile önemli ölçüde örtüşürler. Bu demektir ki, transkripsiyonel olarak inaktif genler farklı hücrelerde nükleer lamina ya da nükleolusların çeperlerine yerleşmişi olarak bulunabilirler.

Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, kromozomların transkripsiyonel birimler ve kromatin modifikasyon bölgelerine karşılık gelen bölgelere bölünmüş olduğu sonucu çıkarılabilir. Transkripsiyonel olarak aktif bölgeler genellikle nükleusun iç kısımlarında bulunurken, inaktif kromatin bölgeleri genellikle nükleer lamina ya da nükleolusa yerleşirler (**Şekil 10.21**). Cevaplanmayı bekleyen ilginç bir soru ise bir genin nükleustaki yerleşiminin ne ölçüde transkripsiyonel aktivitesinin bir nedeni ya da sonucu olduğudur.

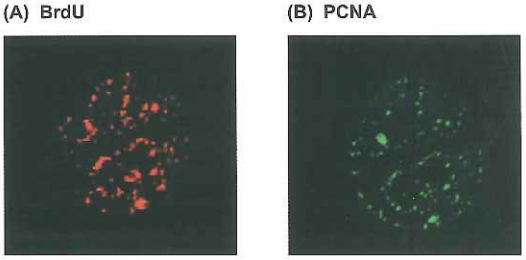


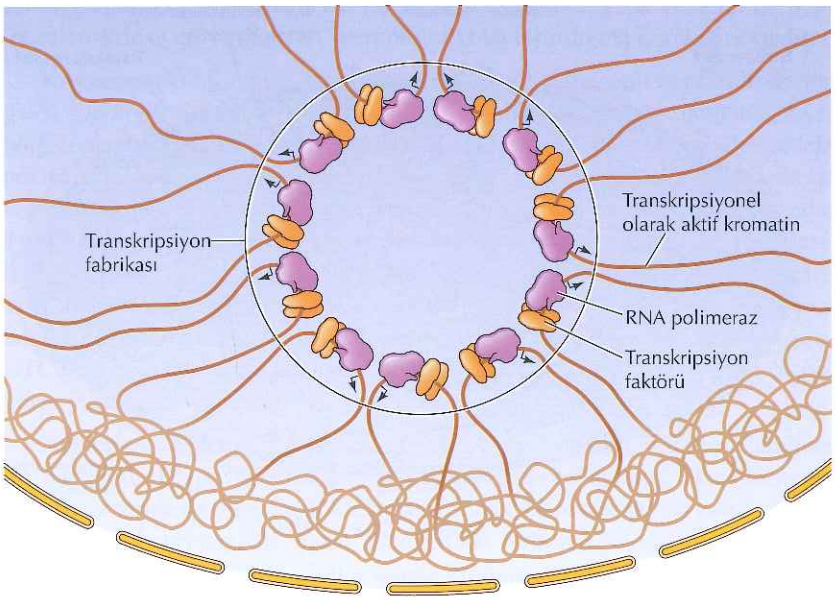
Şekil 10.21 Transkripsiyonel olarak aktif ve inaktif kromatinin dağılımı Transkripsiyonel olarak inaktif heterokromatin bölgeler genellikle lamina (LAD) ya da nükleolus (NAD) ile bağlantılıdır. Transkripsiyonel olarak aktif bölgeler nükleusun iç kısmında yer alırlar. Bölge sınırları çok sayıda CTCF ve kohesin bağlanma bölgeleri içerir.

Replikasyon ve transkripsiyon fabrikaları

Kromatinin fonksiyonel organizasyonun bir diğer örneği, anahtar süreçlerin, bu süreçlerde rol oynayan proteinlerin bir araya gelerek oluşturduğu kompleks protein kümelerinde gerçekleşiyor olmasıdır. Örneğin DNA replikasyonu, **replikasyon fabrikaları** olarak bilinen belirli bölgelerde gerçekleşir. Replikasyon fabrikaları, içerisinde birden fazla DNA molekülünün replikasyonunun gerçekleştiği kümelenmiş (*clustered*) DNA replikasyon bölgeleri içerir. DNA replikasyonunun gerçekleştiği bu belirli bölgeler ilk olarak, yeni sentezlenen DNA'nın bir timidin analoğu olan ve floresan antikorlar ile boyanabilen bromodeoksiüridin kullanılarak görüntülendiği hücre nükleuslarında saptanmıştır (Şekil 10.22A). Bu yeni sentezlenmiş DNA kümelerini içeren bölgelerde aynı zamanda, DNA replikasyonunda görevli proteinler de konsantre biçimde bulunur (Şekil 10.22B). Bu gibi bölgelerden yüzlercesi memeli hücre nükleuslarında bulunur. Herhangi bir anda bir diploid memeli hücresinde yaklaşık 4000 replikasyon orijini aktif durumda bulunabileceğinden, bu kümelenmiş DNA replikasyon bölgelerinden her biri

Şekil 10.22 Replikasyon fabrikaları (A) Hücrelerin kısa süreli olarak, timidinin yerine DNA'nın yapısına katılan *bromodeoksiüridin* (BrdU)'ne maruz bırakılmasıyla yeni replike olmuş DNA işaretlenmiştir. Bu değişiklik, BrdU'yu tanıyan antikorlar ile immün boyama yapılarak yeni sentezlenmiş DNA'nın belirlenebilmesine olanak tanır. Yeni replike olmuş DNA'nın (kırmızı) nükleusa yayılmış belirgin kümeler şeklinde bulunduğuna dikkat ediniz. (B) Aynı kümeler, bir araya toplanmış ve GFP-ile-işaretlenmiş (yeşil) DNA replikasyon proteini PCNA'yı temsil etmektedir (bkz. Şekil 7.7). (H. Leonhart et al., 2000. *J. Cell Biol.* 149: 271 'den alınmıştır.)





Şekil 10.23 Transkripsiyon fabrikaları Transkripsiyon fabrikaları, RNA polimeraz ve transkripsiyon faktörlerinin kümelendiği ve çok sayıda aktif kromatin bölgesinin transkripsiyonunun gerçekleştiği yerlerdir.

çok sayıda replikasyon çatalı barındırmalıdır, muhtemelen fabrika başına 5 ile 50 civarında replikasyon çatalı karşılık gelecektir.

Transkripsiyon da kümelenmiş bölgelerde (**transkripsiyon fabrikaları**) gerçekleşmektedir. Bu bölgeler yeni sentezlenmiş RNA içerirler ve aktif RNA polimerazlar ile transkripsiyon faktörleri yönünden oldukça zengindirler. Bir transkripsiyon fabrikasının yaklaşık 8 RNA polimeraz molekülü içerdiği tahmin edilmektedir. Çok sayıda farklı kromozomal bölge aynı transkripsiyon fabrikasını paylaşabilir ve aktif genlerin ilmekler oluşturduğu ve bu ilmeklerin transkripsiyon sırasında bir fabrikaya doğru çekildiği düşünülmektedir (Şekil 10.23). Bazı durumlarda, ortaklaşa olarak regüle edilen genler aynı fabrika tarafından transkribe ediliyor olabilir. Örneğin, büyük miktarlarda antikor üreten lenfositlerde, farklı kromozomlara yerleşmiş olan immunglobulin genleri aynı transkripsiyon fabrikasına yerleşebilirler. Böylece, transkripsiyon fabrikaları sadece gen ekspresyonunun verimliliğini arttırmakla kalmayıp, ilişkili genlerin ekspresyonlarının koordineli biçimde düzenlenmesine de yardımcı olabilirler.

Nükleer Cisimler

Nükleus, **nükleer cisimler** olarak bilinen aralıklı olarak yerleşmiş çeşitli organellere ev sahipliği yapar. Sitoplazmik organeller (örn., mitokondri) gibi, nükleer cisimler nükleusu bölümlere ayırırlar ve özgül nükleer işlemlerde rol oynayan proteinleri ve RNA'ları konsantre etmekte görev alırlar. Ancak, sitoplazmik organellerin aksine, nükleer cisimler membranlar ile çevrili değillerdir, bunun yerine protein-protein ve protein-RNA etkileşimleri sayesinde devamlılıkları sağlanır. Bunun sonucunda, nükleer cisimler dinamik yapılar olup, içerikleri nükleusun geri kalanı ile değişirilebilir.

En iyi bilinen nükleer cisim, rRNA sentezinde ve ribozom üretiminde görevli olan nükleolustur (bkz. Şekil 10.1). Diğer farklı nükleer cisimler, transkripsiyon, RNA işlenmesi ve ribonükleoprotein komplekslerinin bir araya getirilmesinde görev alırlar (Tablo 10.2). Nükleolus ile, pre-mRNA kesilip-eklenmesinden sorumlu moleküllerin bir araya getirilmesi, olgunlaşması diğer üç nükleer cisimden örnekler aşağıda tartışılmıştır. Bu

Tablo 10.2 Nükleer Cisimlere Örnekler

Nükleer cisim	Nükleus başına cisim sayısı	Fonksiyon
Nükleolus	1-4	rRNA transkripsiyonu, işlenmesi ve ribozom oluşumu
Cajal cismi	0-10	snRNP oluşumu
Clastozom	0-3	Proteasom aracılı proteoliz
Histon lokus cismi	2-4	Histon pre-mRNA'larının transkripsiyonu ve işlenmesi
Benek	20-50	pre-mRNA kırpılma faktörlerinin depolanması
PML cismi	10-30	Transkripsiyonel düzenleme, DNA tamiri
Polikomb cismi	10-20	Gen susturulması

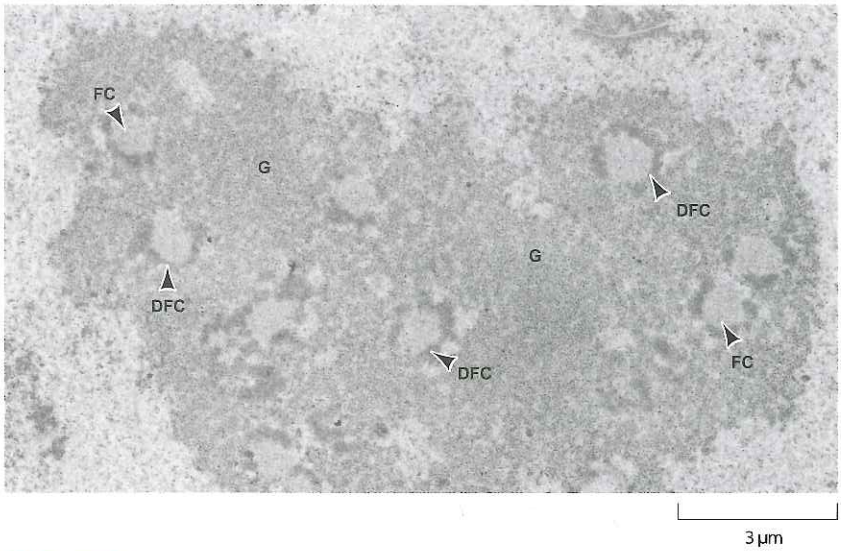
nükleer cisimler gen ekspresyonunun düzenlenmesi ile pre-mRNA'nın kesilip-eklenmesinden sorumlu elemanlarının yapılanması, olgunlaşması ve depolanmasında görev alırlar. Ancak, bu ve diğer nükleer cisimlerin görevleri henüz tam olarak anlaşılamamış olup, nükleusun yapı ve fonksiyonunun bu yönü ile aydınlatılmasına yönelik araştırmalar aktif olarak devam etmektedir.

Nükleolus ve rRNA

rRNA'ların sentezlendiği, işlendiği ve ribozomların bir araya getirildiği bölgeye **nükleolus** (çekirdekçik) adı verilir. Bir önceki bölümde tartışıldığı gibi, hücre protein sentez gereksinimini karşılamak için fazla sayıda ribozoma gereksinim duyar. Aktif olarak çoğalan memeli hücresinde 5 ile 10 milyon civarında ribozom bulunur ve bunların, her bölünmede sentezlenmeleri gerekir. Nükleolus, denetimli ve verimli rRNA sentezi ile ribozomal alt birim yapılması gereksinimini karşılayan bir ribozom üretim fabrikası olarak çalışır. Ökaryotik ribozomlar, 5S, 5,8S, 18S, ve 28S rRNA'lar olarak bilinen dört tip RNA içerir (bkz. Şekil 9.4). 5,8S, 18S ve 28S rRNA'lar nükleolusda, RNA polimeraz I tarafından tek bir birim halinde sentezlenir, 45S ribozomal öncü RNA meydana gelir (bkz. Şekil 8.12). 45S pre-rRNA 40S (küçük) ribozomal alt birimde yer alan 18S rRNA'ya ve 60S (büyük) ribozomal alt birimde yer alan 5,8S ve 28S rRNA'ya işlenir. 60S alt birimde yer alan 5S rRNA'nın transkripsiyonu yüksek memelilerde nükleolus dışında, RNA polimeraz III tarafından gerçekleştirilir.

Çok sayıda rRNA molekülünün transkripsiyon gereksinimini karşılamak için, bütün hücrelerde çok sayıda rRNA gen kopyası bulunur. Örneğin insan genomunda, 5,8S, 18S ve 28S rRNA'ları kodlayan 200 kadar gen kopyası ve 5S rRNA kodlayan 2000 civarında gen kopyası bulunmaktadır. 5,8S,18S ve 28S rRNA genleri, ardışık diziler halinde, beş farklı kromozomda toplanmıştır (kromozom 13, 14, 15, 21 ve 22). 5S rRNA genleri tek ardışık dizilim olarak kromozom l'de bulunur.

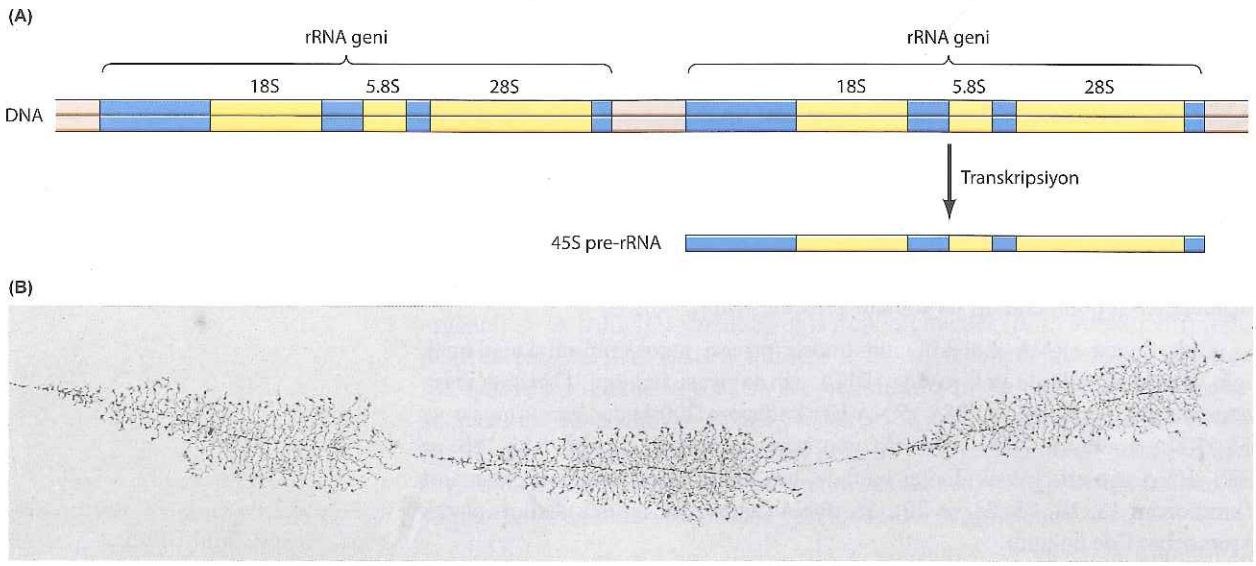
Nükleolus 5,8S, 18S, ve 28S rRNA'ları içeren kromozomal bölgeler çevresinde organize olmuştur, bu nedenle bu bölgeler **nükleolus oluşum bölgeleri** olarak adlandırılırlar. Nükleolusların oluşması için, 45S pre-rRNA'nın transkripsiyonuna gereksinim vardır. Bunu, işlemleme faktörleri ve çekirdekçiğin diğer bileşenlerini içeren küçük nükleolar öncül cisimlerin birleşmesi izler.



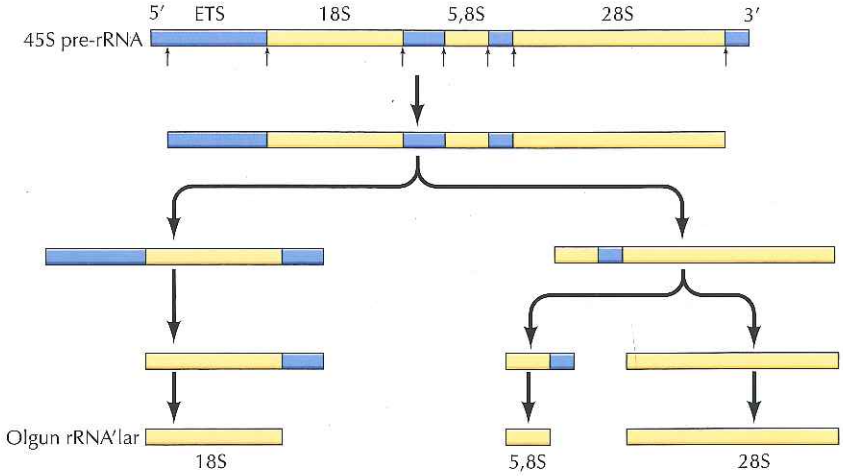
Şekil 10.24 Nükleolusun yapısı Nükleolusun ipliksi merkezini (FC), ipliksi bileşenini (DFC) ve tanecikli bileşenini (GC) gösteren elektron mikrografisi. (David L. Spector, Cold Spring Harbor Laboratuvarları.)

Hücrelerin çoğunda, başlangıçta ayrı olan nükleoluslar kaynaşarak tek bir nükleolus oluşturur. Nükleoluslar morfolojik olarak, bir diğerinden ayırt edilebilen üç bölümden oluşmaktadır: ipliksi (fibriler) bir merkez, yoğun ipliksi bileşen ve tanecikli (granüler) bileşen (Şekil 10.24). Bu farklı alanlar, birbirini takip eden rRNA transkripsiyonu, işlenmesi ve ribozom yapılanması aşamalarının geçtiği yerlerdir. rRNA kodlayan genler ipliksi merkezde yerleşimlidir ve pre-rRNA'nın işlendiği yer olan yoğun ipliksi bileşen ile olan arayüzde transkripsiyona uğrarlar. Daha sonra ribozomal alt birimlerin bir araya getirilmesi tanecikli bileşende gerçekleşir. Nükleolusun boyutları bulunduğu hücrenin metabolik aktivite düzeyine bağlıdır ve aktif protein sentezi yapan hücrelerde büyük nükleoluslar bulunmaktadır. Bu çeşitlilik esas olarak tanecikli bileşenin boyutundaki farklılıklardan kaynaklanır ve ribozom oluşumunun seviyesini yansıtır.

Her bir nükleolus oluşum bölgesi, bir diğerini takip eden ve aralarında transkripsiyonu yapılmayan aralayıcı bölgeler bulunan, rRNA gen toplulukları içerir (Şekil 10.25A). Bu genler RNA polimeraz I tarafından çok aktif olarak



Şekil 10.25 Ribozomal RNA genleri (A) Her bir rRNA geni 18S, 5,8S, ve 28S rRNA'ları içeren tek bir transkripsiyonel birimdir. rRNA genleri, transkripsiyona uğramayan DNA tarafından birbirinden ayrılan, ardışık dizinler şeklinde organize olmuşlardır. (B) Üç rRNA geninin transkripsiyonunu gösteren bir elektron mikrografi. Her bir gen, büyümekte olan RNA zincirlerinin oluşturduğu bir dizin ile çevrelenmiştir ve bunun sonucunda Noel ağacı-benzeri bir görünüm ortaya çıkar. (O. L. Miller Jr.'ın izni ile)



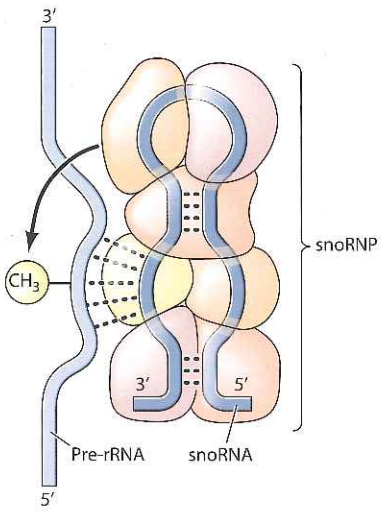
Şekil 10.26 pre-rRNA'nın işlenmesi Yüksek ökaryotlara ait 45S pre-RNA transkripti bir dizi kesim sonrası olgun 18S, 5,8S, ve 28S rRNA moleküllerini oluşturacak biçimde işlenir.

transkribe edilir ve bu nedenle transkripsiyonları elektron mikroskobunda görülebilir. Bu elektron mikroskopilerde, resimlerde, ardışık dizili RNA genlerinin her birinin, sıkı biçimde paketlenmiş uzayan RNA zincirleri ile, yılbaşı ağacına benzer şekilde kaplandığı görülür. (Şekil 10.25B). Uzayan RNA zincirlerinin aşırı yoğunluğu, en yoğun durumda kalıp DNA'daki her yüz baz çiftinde RNA polimeraz molekülü yerleştiğini göstermektedir.

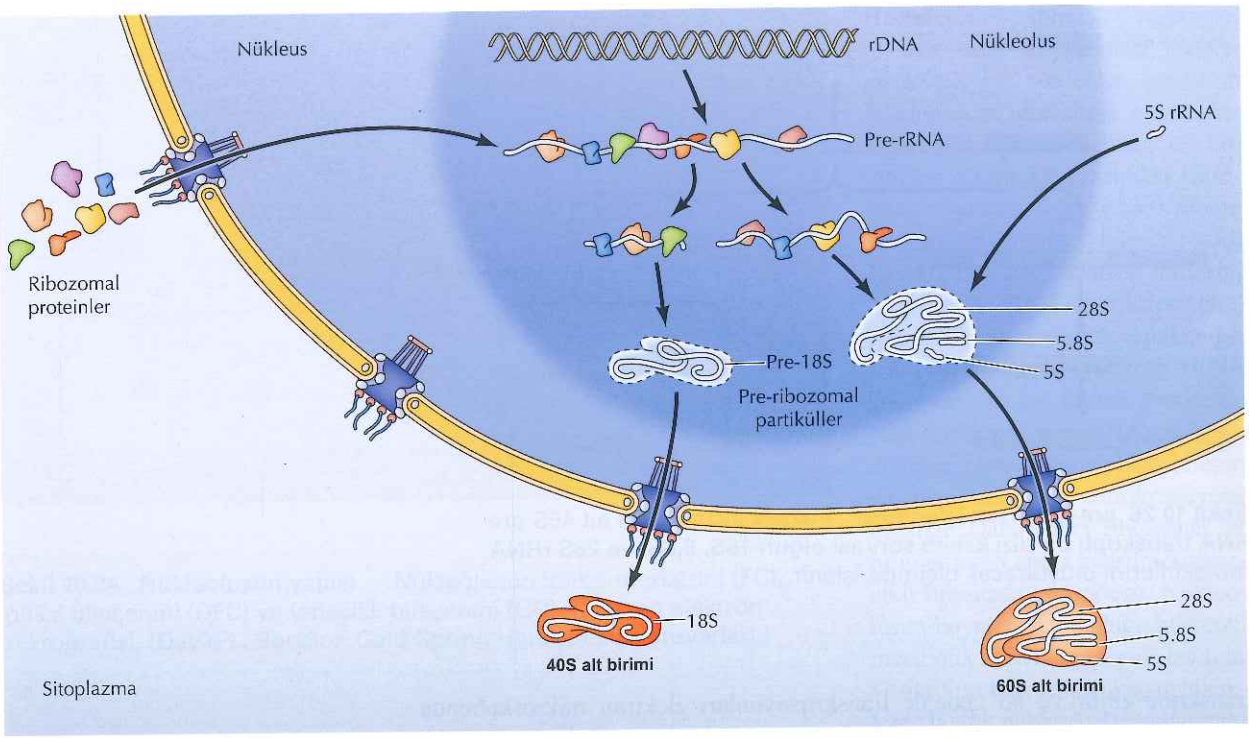
Yüksek ökaryotlarda, RNA genlerinin birincil transkripti 45S pre-rRNA'dır, bu pre-rRNA daha sonra 18S, 5,8S ve 28S rRNA'ları oluşturmak üzere bir dizi kesilime uğrar (Şekil 10.26). Kesilime ek olarak pre-rRNA'nın işlenmesi süreci hem özgül riboz kalıntılarına metil gruplarının eklenmesi hem de üridinin psödoüridine dönüşümü ile sonuçlanan önemli miktarda modifikasyon içerir (bkz. Şekil 8.43). Hayvan hücrelerinde pre-rRNA'nın işlenmesi sırasında, yaklaşık 100 riboz kalıntısı metillenir ve 100 psödoüridin oluşur. Bu modifikasyonların çoğu pre-rRNA'nın sentezi sırasında ya da hemen sonrasında gerçekleşir, ancak çok azı pre-rRNA işlenmesinin sonraki aşamalarda yer alır.

pre-rRNA'nın işlenmesi nükleolusta yerleşik proteinlere ve RNA'lara gereksinim duyar. Nükleoluslar, pre-rRNA işlenmesinde görev alan 300'den fazla protein ve yaklaşık 200 kadar **küçük nükleolar RNA (snoRNA)** içerir. Pre-mRNA işlenmesinde görevli splaysozomal snRNA'larda olduğu gibi (Bölüm 8'de tartışıldı), snoRNA'lar da proteinlerle kompleks yaparak snoRNP'leri oluştururlar. Her bir snoRNP, tek bir snoRNA ile ilişkili sekiz - on proteinden oluşur. Pre-mRNA üzerinde splaysozomların şekillenmesindekine benzer biçimde, snoRNP'ler pre-rRNA'larla birleşerek işlemleme kompleksleri oluşturur.

snoRNA'ların işleyişi, pre-mRNA kesilip-eklenmesini gerçekleştiren snRNA'larınkinden farklıdır (Bölüm 8'de tartışıldı). snRNA'ların aksine snoRNA'lar, pre-rRNA moleküllerini özgül modifikasyonlar için protein enzimlere yönlendiren rehberler olarak görev yaparlar. Riboz metilasyonu ya da psödoüridin oluşumunu katalizleyen ve farklı proteinler ile



Şekil 10.27 pre-rRNA baz modifikasyonunda snoRNA'ların rolü snoRNA'lar rRNA'ya komplementer kısa diziler içerirler. snoRNA'lar ile pre-rRNA'lar arasında baz eşleşmesi, pre-rRNA modifikasyonu (örn., metilasyon) yapacak enzimi uygun yere yönlendirir.



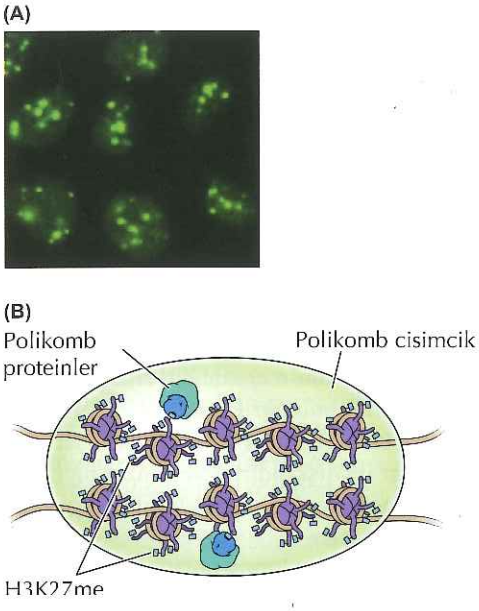
Şekil 10.28 Ribozom yapılanması Ribozomal proteinler sitoplazmadan nükleolusa taşınırlar ve henüz kesilmemiş pre-rRNA ile birleşirler. pre-rRNA işlenince, ek ribozomal proteinlerin ve 5S rRNA'nın da (nükleusun farklı bir yerinde sentezlenir) eklenmesiyle ribozom öncül partikülleri oluşur. Olgunlaşmanın son aşamaları, ribozom öncül partiküllerinin, 40S ve 60S ürünleri oluşturmak üzere sitoplazmaya gönderilmesi sonrasında tamamlanır.

etkileşen iki farklı snoRNA ailesi bulunur (**Şekil 10.27**). snoRNA'lar, 18S ya da 28S rRNA'ya komplementer, yaklaşık 15 nükleotidlik kısa diziler içerirler. Önemli olarak, bu komplementer bölgeler rRNA'daki baz modifikasyonlarının gerçekleştiği bazları içerir. snoRNA'lar pre-rRNA'nın özgül bölgeleri ile baz eşleşmesi oluşturarak, metilasyon ya da psödoüridilasyondan sorumlu proteinleri, pre-rRNA molekülü üzerindeki doğru bölgeye yönlendirilirler.

Ribozomların yapılanması, ribozomal öncül RNA ile ribozomal proteinlerin ve 5S rRNA'nın bir araya gelmesini gerektirir (**Şekil 10.28**). Ribozomal proteinleri kodlayan genler, RNA polimeraz II tarafından nükleolus dışında okunur ve sentezlenen mRNA'ların proteine translasyonu sitoplazmik ribozomlarda gerçekleşir. Ribozomal proteinler daha sonra sitoplazmadan nükleolusa taşınırlar ve burada rRNA'lar ile birleşerek, öncül ribozomal partikülleri oluştururlar. 5S rRNA geninin transkripsiyonu nükleolus dışında, RNA polimeraz III enzimiyle yapılmasına karşın, 5S rRNA'lar öncül ribozomal partiküllerle nükleolusda birleşir. Ribozom olgunlaşmasının son basamağı, ribozom öncülü partiküllerin sitoplazmaya taşınması ve ökaryotlarda 40S ve 60S aktif ribozom alt birimlerinin oluşumudur.

Polikomb cisimcikleri: Transkripsiyonel baskılanma merkezleri

Bölüm 8'de tartışıldığı gibi, Polikomb proteinleri histon H3-lizin metilasyonu



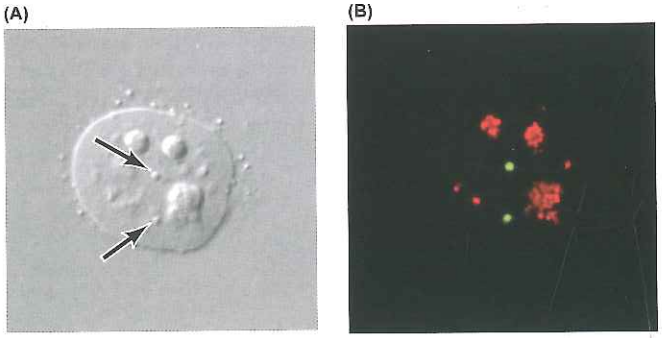
Şekil 10.29 Polikomb cisimcikleri (A) GFP-ile işaretlenmiş Polikomb proteini eksprese eden insan hücre nükleusları. (B) Polikomb cisimcikleri, histon H3 lizin 27 metilasyonu (H3K27me) ile baskılanmış gen kümeleri içerir. (A, V. Pirrotta ve H. B. Li, 2012. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22:101'den alınmıştır.)

aracılığı ile çok çeşitli genlerin baskılanmasından sorumludur. Polikomb proteinleri iki kompleksten oluşur: biri metile olmuş H3-lizin-27 kalıntılarına bağlanır, diğeri ise yakınındaki H3-lizin-27 rezidülerini metiller. Bunun sonucunda, H3-lizin-27 rezidülerinin metilasyonu yakınlardaki nükleozomlara yayılır ve baskılanmış kromatin bölgeleri oluşturur (bkz. Şekil 8.36). Polikomb proteinlerinin nükleer yerleşiminin immünfloresan ile analizi, bu proteinlerin göreceli az sayıda bulunan ve **Polikomb cisimcikleri** olarak bilinen yapılarda toplandığını, nükleus içine dağılmadığını göstermiştir (**Şekil 10.29A**).

Polikomb cisimcikleri sıklıkla heterokromatin ile ilişkilidir, ki bu durum gen baskılanmasındaki rolleri ile tutarlıdır. Bazı durumlarda polikomb cisimcikleri, bir dizi ardışık genin Polikomb proteinleri tarafından baskılanması sonucu oluşabilir. Ancak en azından bazı Polikomb cisimcikleri, farklı kromozomal bölgelerdeki baskılanmış bölgelerin oluşturduğu kümeleri içerir (**Şekil 10.29B**). Transkripsiyonun koordine edildiği transkripsiyon fabrikalarına benzer olarak (bkz. Şekil 10.23), Polikomb cisimcikleri de eşgüdümlü olarak baskılanan genlerin kümelendiği bölgelerdir.

Cajal cisimcikleri ve benekler: snRNP'lerin işlenmesi ve depolanması

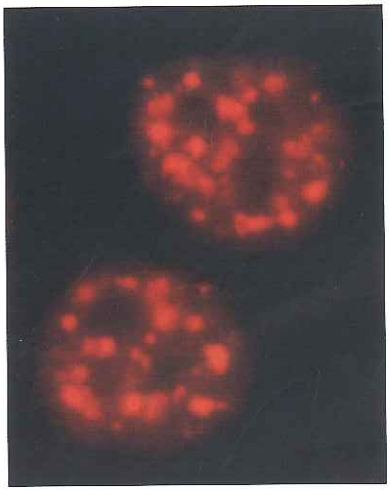
Hem Cajal cisimcikleri hem de nükleer benekler, pre-mRNA'ların kesilip-eklenmesinden sorumlu snRNP'lerin bir araya getirilmesi ve depolanmasında önemli roller oynar. İlk olarak 1906 yılında Ramony Cajal tarafından tanımlanan Cajal cisimcikleri, snRNP'ler ve diğer RNA-protein komplekslerinin bir araya getirilmesinde rol oynayan küçük nükleer cisimciklerdir. Bu bölümde daha önce üzerinde durulduğu gibi, snRNA'lar ilk olarak sitoplazmaya taşınırlar ve burada proteinler ile birleşerek nükleusa dönecek olan snRNP'leri oluştururlar (bkz. Şekil 10.14). snRNP'ler daha sonra, olgunlaşmalarının son aşamalarının gerçekleştiği Cajal cisimlerinde yoğunlaşırlar. Bu aşamalar sırasında, pre-rRNA'ların nükleolusta geçirdikleri modifikasyonlara benzer biçimde, snRNA'lar riboz metilasyonu ve psödoüridilasyona uğrarlar. snRNA'ların Cajal cisimlerinde işlenmesi



Şekil 10.30 Nükleusda Cajal cisimleri (A) Bir insan hücresinin nükleusunun diferansiyel interferens kontrast mikroskop görüntüsü. Oklar iki Cajal cismini işaret etmektedir. (B) Aynı nükleusun Koilin (yeşil) ve Fibrillarin (kırmızı) proteinlerine karşı antikorlarla immünfloresan boyaması. Fibrillarin hem nükleusun yoğun ipliksi bölgelerinde hem de Cajal cisimde bulunur. Koilin ise sadece Cajal cisimlerde belirlenebilir.(J. G. Gall, 2000. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 273'den alınmıştır.)

ile uyumlu olarak, RNA metilasyonundan sorumlu enzim (fibrillarin) Cajal cisimcikleri ve nükleoluslarda yoğun olarak bulunur (Şekil 10.30). Ayrıca, Cajal cisimcikleri kendilerine özgü küçük RNA'lar (scaRNA'lar) içerirler. scaRNA'lar, nükleoluslardaki snoRNA'lar ile ilişkilidirler ve benzer biçimde, Cajal cisimlerindeki snRNA'ların riboz metilasyonu ve psödoüridilasyonuna yön veren rehber RNA'lar olarak görev yaparlar.

snRNP oluşumundaki rollerine ek olarak Cajal cisimlerinin, kromozom uçlarındaki DNA'nın replikasyonunda hayati öneme sahip olan telomerazın yapılanmasında da rol oynadıkları düşünülmektedir. Bölüm 7'de tartışıldığı gibi telomeraz, kromozom uçlarındaki (telomer) dizileri tanıyan bir RNA ile telomeraz RNA'sını kalıp olarak kullanarak bu uç dizileri kopyalayan bir revers transkriptazın bir araya gelerek oluşturduğu bir komplekstir (bkz. Şekil 7.16). Cajal cisimcikleri telomeraz RNA-protein kompleksinin oluşumunu destekleyebileceği gibi bu kompleksin telomerlere yerleşimini de sağlayabilir.



Cajal cisimlerinde oluşumunu ve olgunlaşmasını tamamlayan snRNP'ler **nükleer beneklere** (*speckles*) taşınır. Bu benekler, mRNA kesilip-eklenmesinde görevli bileşenleri içeren, aralıklı yerleşmiş nükleer yapılardır (Şekil 10.31). Kesilip eceği-eklenme faktörleri ve snRNP'ler, nükleusta homojen biçimde dağılmak yerine beneklerde toplanırlar. Beneklerin, kesilip-eklenme bileşenlerinin depolandığı bir yapı olduğu düşünülmektedir. Bu bileşenler daha sonra pre-mRNA işlenmesinin gerçekleştiği, aktif olarak transkripsiyona uğrayan genlerde toplanırlar.

Şekil 10.31 Nükleer benekler İmmünfloresan antikorlarla boyama, kesip-ekleme faktörlerinin çekirdek içerisindeki aralıklı yerleşmiş belirgin cisimlerde yoğunlaşmış olduğunu göstermiştir. (David L. Spector'nin izniyle, Cold Spring Harbor Laboratuvarları)

ÖZET

Nükleer Zarf ve Nükleus ile Sitoplazma Arasındaki Trafik

- ***Nükleer zarfın yapısı:*** Ökaryot hücrelerinde nükleer zarf, nükleus bileşenlerini sitoplazmadan ayırır, nükleusu genetik maddeye ev sahipliği yapan biyokimyasal kompartman olarak korur, transkripsiyonun gerçekleşeceği ve RNA işlenmesinin yapılacağı yerleri belirler. Nükleer zarf, birbiriyle nükleer por kompleksinde birleşen, iç ve dış zarlardan ve bunların altında yer alan çekirdek laminasından oluşur.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

nükleer zarf, nükleer zar, nükleer lamina, lamin

ÖZET

- ***Nükleer por kompleksi:*** Nükleer por kompleksleri, moleküllerin sitoplazma ile nükleus arasında gidip geldikleri yegane yol olan, büyük yapılardır. Küçük moleküller açık por komplekslerinden serbestçe geçebilir. Makromoleküller, enerji gerektiren bir süreçle, ya nükleustan sitoplazmaya ya da sitoplazmadan nükleusa seçilerek taşınır. Bkz. **Video 10.1.**
- ***Proteinlerin nükleusa ve nükleustan seçici taşınımı:*** Nükleusa alınması planlanan proteinler, reseptörler tarafından tanınan nükleusa yerleşim sinyali içerirler ve por kompleksi içerisinden geçirilirler. Nükleus ile sitoplazma arasında mekik dokuyan proteinler, kendilerini nükleustan sitoplazmaya hedefleyen, nükleustan çıkış sinyalleri içerirler. Genellikle, nükleer por kompleksinden geçiş için, küçük GTP bağlayan bir protein olan Ran gereklidir ve bu protein geçişin yönünü belirler. Bkz. **Animasyon 10.1** ve **Video 10.2.**
- ***RNA'ların taşınması:*** RNA' lar, nükleer por komplekslerinden ribonükleoprotein kompleksleri halinde taşınırlar. Mesajcı RNA' lar, ribozomal RNA' lar ve taşıyıcı RNA' lar, protein sentezinde görev yapmak üzere nükleustan çıkartılırlar. Çeşitli küçük nükleer RNA tipleri, önce nükleustan sitoplazmaya geçerek bazı proteinlerle birleşir ve RNP' leri oluştururlar, sonra nükleusa geri dönerler.
- ***Nükleer protein alımının (import) düzenlenmesi:*** Transkripsiyon faktörleri gibi bazı proteinlerin aktiviteleri, nükleusa giriş-çıkışlarının düzenlenmesi ile denetlenir.

Kromozomların Organizasyonu

- ***Kromozom bölgeleri (chromosome territories):*** Her bir kromozom nükleus içinde belli bir bölgeye yerleşir ve bağımsız birimler olarak görev yapan büyük, ilmek şeklinde bölgelere bölünmüştür.
- ***Kromatin yerleşimi ve transkripsiyonel aktivite:*** Transkripsiyonel olarak inaktif heterokromatin sıklıkla nükleer zarf ya da nükleolus ile ilişkili iken, transkripsiyonel olarak aktif kromatin nükleusun iç kısımlarında yer alır.
- ***Replikasyon ve transkripsiyon fabrikaları:*** DNA replikasyonu çok sayıda replikasyon çatalı içeren büyük kompleksler içinde gerçekleşir. Transkripsiyon da RNA polimeraz ve transkripsiyon faktörlerince zengin, kümelenmiş bölgelerde gerçekleşir.

Nükleer Cisimler

- ***Nükleolus ve rRNA:*** Çok sayıda farklı nükleer cisim, nükleusu bölümlere ayırır ve gen ekspresyonunun çeşitli aşamalarında görev alan protein ve RNA' ları bir araya getirirler. Nükleolus ribozomal RNA genleriyle ilişkilidir. rRNA transkripsiyonunun ve rRNA işlenmesinin yapıldığı, ribozomların yapılandığı ve bazı küçük RNA' ların modifiye oldukları bölgedir. Pre-rRNA' ların işlenmesi küçük nükleolar RNA' lar (snoRNA) tarafından gerçekleştirilir.
- ***Polikomb cisimcikleri: Transkripsiyonel baskılanma merkezleri:*** Histon metilasyonu aracılığı ile çok sayıda farklı geni baskılayan Polikomb proteinleri, birden çok kromatin bölgesinin baskılandığı kümelerde yoğunlaşırlar.
- ***Cajal cisimleri ve benekler: snRNP' lerin işlenmesi ve depolanması:*** Cajal cisimleri snRNA modifikasyonu, snRNP oluşumu ve telomeraz yapılanmasında görev alırlar. Nükleer benekler, snRNP'lerin ve pre-mRNA kesilip-eklenmesinde rol oynayan diğer bileşenlerin depolanma merkezleridir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

nükleer por kompleksi

nükleer yerleşim sinyali, nükleer taşınım reseptörü, importin, Ran, nükleer çıkış (eksport) sinyali, eksportin, karyoferin

ökromatin, heterokromatin, lamin-ilişkili domain (LAD), nükleolus-ilişkili domain (NAD)

replikasyon fabrikası, transkripsiyon fabrikası

nükleer cisim, nükleolus, nükleolus oluşum bölgesi, küçük nükleolar RNA (snoRNA)

Polikomb cisimciği

Cajal cisimciği, benek

Atıf

Hücre
Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Sorular

1. Transkripsiyonu translasyondan ayıran nükleer zarf, ökaryotların, prokaryotlarda bulunmayan bir işlemle gen ekspresyonunu düzenlemesine olanak sağlar. Ökaryotlara özel olan bu işlemler nelerdir?
2. Laminler nükleer yapı ve işlevde hangi iki görevi üstlenir?
3. Bir kurbağa yumurtasına iki globüler protein enjekte ediyorsunuz: proteinlerin birisi 15 kd diğeri ise 100 kd olup, ikisinde de herhangi bir nükleer yerleşim sinyali bulunmuyor. Bu iki proteinden herhangi biri nükleusa girer mi?
4. Nükleusa girişin yönünü ne belirler?
5. Gen-denetleyen bir transkripsiyon faktörünün aktivitesinin, nükleusa alımla nasıl düzenleneceğini açıklayınız.
6. Serin kalıntılarının fosforillenmesi sonucu nükleer yerleşim sinyalinin bozulması üzerinden aktivitesi düzenlenen bir transkripsiyon faktörüyle çalışıyorsunuz. Bu serinleri alaninle değiştiren bir mutasyon, transkripsiyon faktörünün hücre içi yerleşimini ve hedef genin ekspresyonunu nasıl etkiler?
7. Normalde nükleus ile sitoplazma arasında mekik dokuyan bir proteinde nükleer çıkış sinyalini etkisizleştiren bir mutasyon, hücre içi dağılımını nasıl etkiler?
8. DNA replikasyonu görünüşe göre replikasyon fabrikaları olarak da bilinen özgül bölgelerde gerçekleşmektedir. Bu bölgelerin yerleşimini, kültür ortamındaki memeli hücrelerinde nasıl belirlerdiniz?
9. Smith ve arkadaşları, T antijeninin 126 ile 132. amino asitleri arasında kalan dizinin, bu proteinin nükleusta birikmesi için yeterli olduğunu nasıl göstermişlerdir?
10. Nükleer benekler neden önemlidir?
11. snoRNA'ların fonksiyonu nedir?
12. İnsandaki eksportin-t'ye karşı RNAi uygulanması durumunda, kültür ortamındaki insan fibroblastları bundan nasıl etkilenir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

(Her ana bölüm için en önemli anahtar derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Nükleer Zarf ve Nükleus ile Sitoplazma Arasında Trafik

Bank, E. M. and Y. Gruenbaum. 2011. The nuclear lamina and heterochromatin: a complex relationship. *Biochem. Soc. Trans.* 39: 1705-1709. [R]

Burke, B. and C. L. Stewart. 2013. The nuclear lamins: flexibility in function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 13-24. [R]

Chook, Y. M . and K. E. Suel. 2011. Nuclear import by karyopherin-betas: recognition and inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* 1813: 1593-1606. [R]

Gerace, L. and M. D. Huber. 2012. Nuclear lamina at the crossroads of the cytoplasm and nucleus. *J. Struc. Biol.* 177: 24-31. [R]

Grossman, E., O. Medalia and M. Zwerger. 2012 . Functional architecture of the nuclear pore complex. *Ann. Rev. Biophys* . 41: 557-584. [R]

Grunwald, D., R. H. Singer, and M. Rout. 2011. Nuclear export dynamics of RNA protein complexes. *Nature* 475: 333-341. [R]

Guttler, T. and D. Gorlich. 2011. Randependent nuclear export mediators: a structural perspective. *EMBO J.* 30: 3457-3474. [R]

Kohler, A. and E. Hurt. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 761-773. [R]

Matera, A. G., R. M. Terns and M. P. Terns. 2007. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 209-220. [R]

Simon, D. N. and K. L. Wilson. 2011. The nucleoskeleton as a genome-

associa ted dynamic 'network of networks.' *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 695-708. [R]

Starr, D. A. and H. N . Fridolfsson. 2010. Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 26: 421-444. [R]

Stewart, M. 2007. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 195-208. [R]

Stewart, M . 2010. Nuclear export of mRNA. *Trends Biochem. Sci.* 35: 609-617. [R]

Strambio-De-Castillia, C., M. Niepel and M. P. Rout. 2010. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 490-500. [R]

Walde, S. and R. H. Kehlenback. 2010. The Part and the Whole: functions of nucleoporins in nucleocytoplasmic transport. *Trends Cell Biol.* 20: 461-469. [R]

Kromozomların Organizasyonu

Amendola, M. and B. van Steensel. 2014.Mechanisms and dynamics of nuclear lamina-genome interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 28: 61-68. [R]

Bickmore, W. A. 2013. The spatial organization of the human genome. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 14: 67-84. [R]

Bickmore, W. A. and B. van Steensel. 2013. Genome architecture: domain organization of interphase chromosomes. *Cell* 152:1270-1284. [R]

Buckley, M.S. and J. T. Lis. 2014. Imaging RNA polymerase II transcription sites in living cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 25: 126-130. [R]

Cremer, T. and M. Cremer. 2010. Chromosome territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2: a003889. [R]

Edelman, L. B. and P. Fraser. 2012. Transcription factories: genetic programming in three dimensions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22: 110-114. [R]

Mekhail, K. and D. Moazed. 2010. The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 317-328. [R].

Padeken, J. and P. Heun. 2014. Nucleolus and nuclear periphery: Velcro for heterochromatin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 28: 54-60. [R]

Misteli, T. 2013. The cell biology of genomes: bringing the double helix to life. *Cell* 152: 1209-1212. [R]

Park, S.-K., Y. Xiang, X. Feng and W. T. Garrard. 2014. Pronounced cohabitation of active immunoglobulin genes from three different chromosomes in transcription factories during maximal antibody synthesis. *Genes Dev.* 28: 1159-164. [P]

Sexton, T. and G. Cavalli. 2015. The role of chromosome domains in shaping the functional genome. *Cell* 160: 1049-1059. [R]

Van Bortle, K. and V. G. Corces. 2012. Nuclear organization and genome function. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 28: 163-187. [R]

Nükleer Cisimler

Bernardi, R. and P. P. Pandolfi. 2007. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 1006-1016. [R]

Bratkovic, T. and B. Rogelj. 2014. The many faces of small nucleolar RNAs. *Biochim. Biophys. Acta* 1839: 438-443. [R]

Dundr, M. 2012. Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24: 415-422. [R]

Mao, Y. S., B. Zhang and D. L. Spector. 2011. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet.* 27: 295-306. [R]

Nizami, Z., S. Deryusheva and J. G. Gall. 2010. The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2:a000653. [R]

Pederson, T. 2011. The nucleolus. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3:a000638. [R]

Pirrotta, V. and H.-B. Li. 2012. A view of nuclear Polycomb bodies. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22: 101-109. [R]

Sleeman, J. E. and L. Trinkle-Mulcahy. 2014. Nuclear bodies: new insights into assembly/dynamics and disease relevance. *Curr. Opin. Cell Biol.* 28: 76-83. [R]

Spector, D. L. and A. I. Lamond. 2011. Nuclear speckles. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3:a000646. [R]

BÖLÜM 11

Protein Tasnifi ve Taşınması

Endoplazmik Retikulum, Golgi Aygıtı ve Lizozomlar

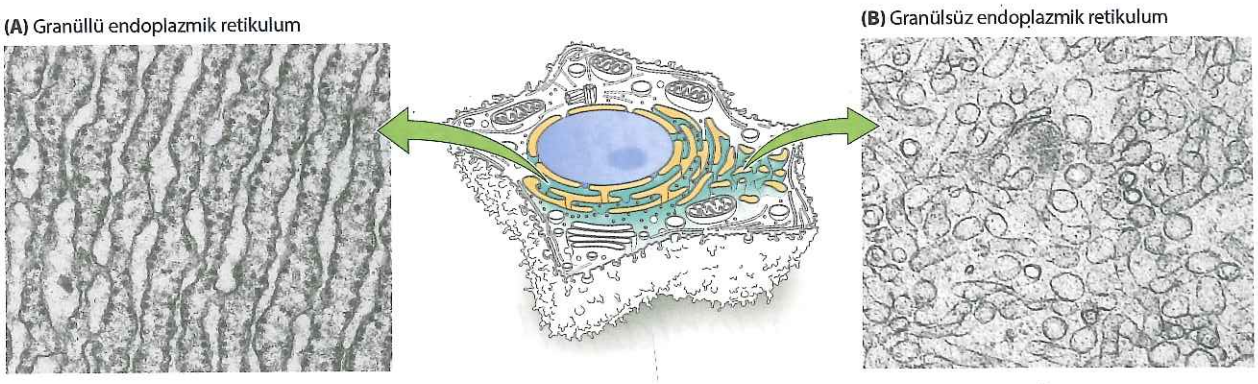
Endoplazmik Retikulum 397
Golgi Aygıtı 421
Veziküllе Taşınma Mekanizması 430
Lizozomlar 436
Anahtar Deney
Sinyal Hipotezi 402
Moleküler Tıp
Gaucher Hastalığı 437

Ökaryot hücrelerin sitoplazmasında, bir çekirdek varlığına ek olarak zarla çevrili çeşitli organeller vardır. Bu organeller, farklı hücresel işlevlerin sürdürüldüğü özel bölmelerin oluşumunu sağlar. Sitoplazmanın işlevsel olarak bölünmesi, ökaryot hücrelerin büyük boyutlarına rağmen (bir bakteri hacminin yaklaşık bin katı) verimli çalışmasını olanaklı kılar.

Ökaryot hücrelerin karmaşık iç organizasyonları göz önüne alındığında, proteinlerin sınıflandırılması ve doğru hedeflere taşınması oldukça önemli görevlerdir. Sınıflandırmanın ilk basamağı proteinlerin sentezi (translasyon) sırasında gerçekleşir. Endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, lizozomlar ve plazma zarına hedeflenen veya salgılanacak olan pek çok protein endoplazmik retikulum zarına bağlı ribozomlarda sentezlenir. Translasyon sürerken, sentezlenen polipeptid zincirleri, protein katlanması ve işlemlenmesi için endoplazmik retikulum içine transfer edilir. Endoplazmik retikulumdan veziküller (kesecikler) aracılığı ile Golgi aygıtına taşınırlar ve burada işlenerek; endozomlara, lizozomlara, hücre zarına taşınmak veya hücreden salgılanmak üzere sınıflandırılırlar. Bu organellerin bazıları ayrıca hücre dışından alınan proteinlerin sınıflandırılma ve taşınmalarına da katkıda bulunur (bkz. Bölüm 14). Protein işlenmesi ve veziküler taşınmadaki rolleri nedeniyle, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, endozom ve lizozomlar diğer sitoplazmik organellerden ayrılırlar. Tüm hücresel proteinlerin yaklaşık üçte birinin endoplazmik retikulumda işleniyor olması, hücre fizyolojisi açısından bu yolağın önemini vurgulamaktadır.

Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum (ER) nükleer zardan sitoplazma içine uzanan, zarla çevrili boru ve keselerden (sarnıç) oluşmuş bir ağ yapısıdır (**Şekil 11.1**). Tüm endoplazmik retikulum, kesintisiz bir zar yapısıyla çevrelenmiştir ve çoğu ökaryot hücrede en büyük organeldir. Zarı tüm hücresel zarların yaklaşık yarısını oluşturabilmekte, iç hacmi (lümen veya sarnıç alanı) toplam hücre hacminin yaklaşık %10'unu temsil edebilmektedir. Aşağıda tartışılacağı gibi, ER'de, hücre içerisinde farklı işlevlere sahip iki kesintisiz zar alanı bulunur. Dış yüzeyi (sitozolik yüzey) ribozomlarla kaplı **granüllü ER** protein işlemlenmesinde rol oynar. **Granülsüz ER**'nin ise ribozomlarla ilişkisi yoktur ve protein değil, lipid metabolizmasında görev alır.



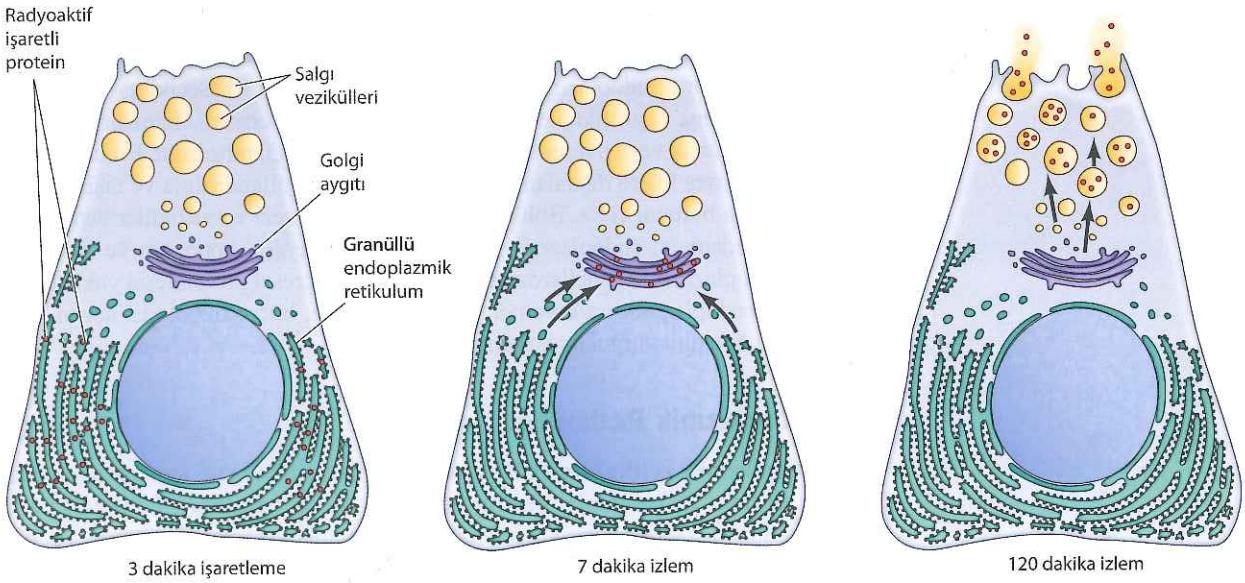
Şekil 11.1 Endoplazmik retikülum (ER) (A) Sıçan karaciğer hücrelerinde granüllü ER'nin elektron mikrografisi. Ribozomlar ER zarının sitozolik yüzeyine tutunmuşlardır (B) Steroid hormon sentezinde aktif testis Leydig hücrelerinde granüllü ER'nin elektron mikrografisi.

Bilgi İçin

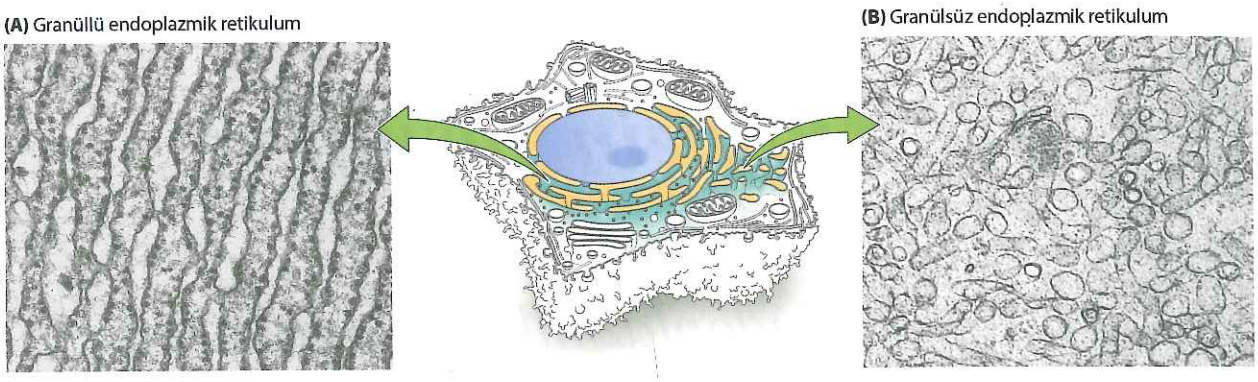
Endoplazmik retikulüm hücre içi kalsiyumun ana depolanma yeri olması nedeniyle aynı zamanda sinyal iletiminde de anahtar rol oynar. Uygun uyarılar sonucu ER'den serbestleşen kalsiyum anahtar konumdaki sitozolik proteinlerin aktivitelerini değiştirerek kas kasılmasında çok önemli rol oynar. (Bkz. Bölüm 13 ve 16)

Endoplazmik retikulum ve protein salgılanması

Endoplazmik retikulumun protein işlenmesi ve sınıflanmasındaki rolü ilk olarak 1960'larda George Palade ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Şekil 11.2). Bu araştırıcılar ince bağırsağa sindirim enzimleri salgılayan pankreasın özgülleşmiş hücrelerinde (pankreas asiner hücreleri), yeni sentezlenen proteinlerin yazgısını araştırdılar. Bu hücreler tarafından sentezlenen proteinlerin çoğu salgılandığından, Palade ve arkadaşları "iz



Şekil 11.2 Salgı yolağı Yeni sentezlediği proteinlerin büyük bölümünü sindirim sistemine boşaltan pankreatik asinar hücreleri, proteinlerin hücre içi trafiğini incelemek amacıyla radyoaktif amino asitler ile işaretlendi. Radyoaktif amino asitler ile 3 dakikalık bir inkübasyon sonrasında yeni sentezlenen proteinlerin granüllü ER'ye lokalize olduğu otoradyografi ile gösterildi (deneyin "pulse", işaretleme evresi). Non-radyoaktif amino asitler ile inkübasyonu takiben, proteinlerin ER'den Golgi aparatına taşındığı, daha sonra da salgı vezikülleri aracılığıyla plazma zarına ve hücre dışına hareket ettiği izlendi (deneyin "*chase*", kovalama evresi).



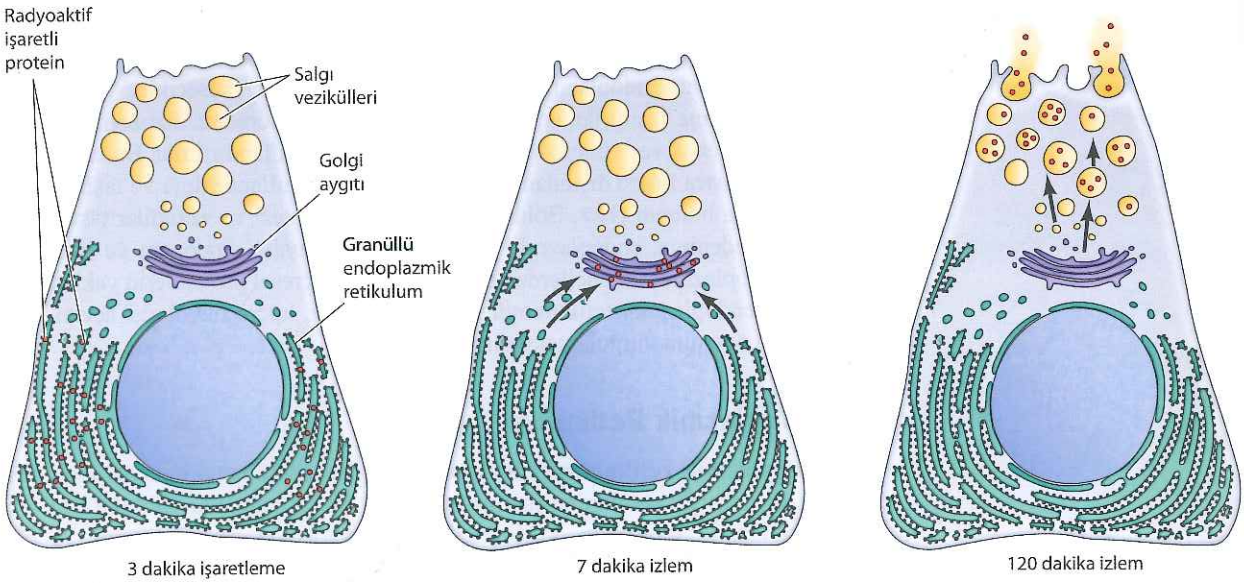
Şekil 11.1 Endoplazmik retikülum (ER) (A) Sıçan karaciğer hücrelerinde granüllü ER'nin elektron mikrografisi. Ribozomlar ER zarının sitozolik yüzeyine tutunmuşlardır (B) Steroid hormon sentezinde aktif testis Leydig hücrelerinde granüllü ER'nin elektron mikrografisi.

Bilgi İçin

Endoplazmik retikulüm hücre içi kalsiyumun ana depolanma yeri olması nedeniyle aynı zamanda sinyal iletiminde de anahtar rol oynar. Uygun uyarılar sonucu ER'den serbestleşen kalsiyum anahtar konumdaki sitozolik proteinlerin aktivitelerini değiştirerek kas kasılmasında çok önemli rol oynar. (Bkz. Bölüm 13 ve 16)

Endoplazmik retikulum ve protein salgılanması

Endoplazmik retikulumun protein işlenmesi ve sınıflanmasındaki rolü ilk olarak 1960'larda George Palade ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Şekil 11.2). Bu araştırıcılar ince bağırsağa sindirim enzimleri salgılayan pankreasın özgülleşmiş hücrelerinde (pankreas asiner hücreleri), yeni sentezlenen proteinlerin yazgısını araştırdılar. Bu hücreler tarafından sentezlenen proteinlerin çoğu salgılandığından, Palade ve arkadaşları "iz



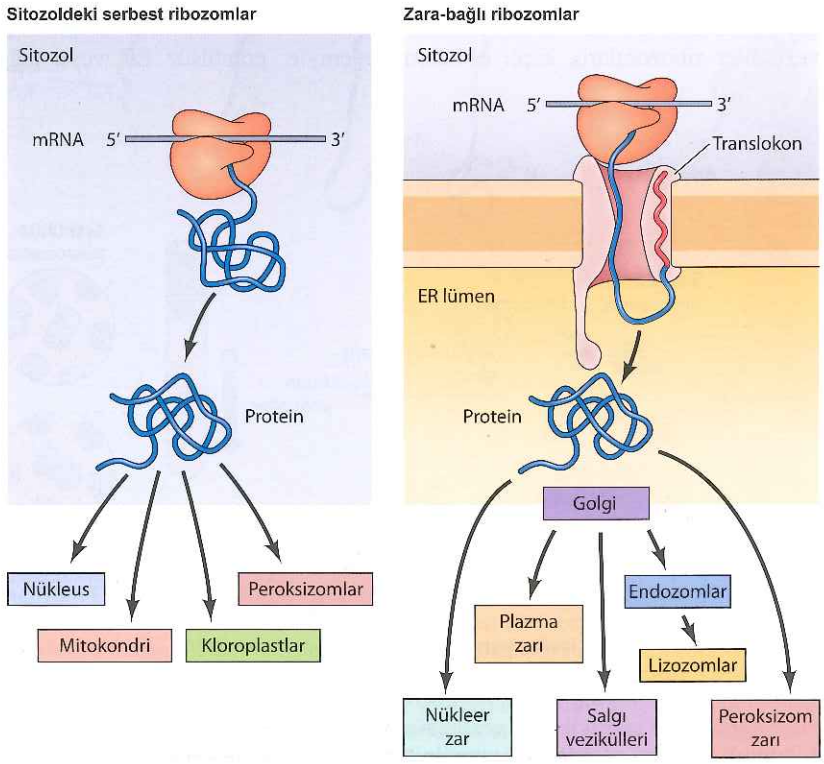
Şekil 11.2 Salgı yolağı Yeni sentezlediği proteinlerin büyük bölümünü sindirim sistemine boşaltan pankreatik asinar hücreleri, proteinlerin hücre içi trafiğini incelemek amacıyla radyoaktif amino asitler ile işaretlendi. Radyoaktif amino asitler ile 3 dakikalık bir inkübasyon sonrasında yeni sentezlenen proteinlerin granüllü ER'ye lokalize olduğu otoradyografi ile gösterildi (deneyin "pulse", işaretleme evresi). Non-radyoaktif amino asitler ile inkübasyonu takiben, proteinlerin ER'den Golgi aparatına taşındığı, daha sonra da salgı vezikülleri aracılığıyla plazma zarına ve hücre dışına hareket ettiği izlendi (deneyin "*chase*", kovalama evresi).

sürme" (pulse-chase) olarak bilinen bir yöntemle, yeni sentezlenen proteinleri radyoaktif amino asitler ile işaretleyerek, salgılanacak proteinlerin hücre içinde izledikleri yolu inceleyebildiler. Radyoaktif işaretli proteinlerin hücre içi yerleşimleri oto-radyografi ve elektron mikroskopi ile gösterilerek protein salgılanmasında rol oynayan hücresel bölgeler ortaya çıkarılabildi. Pankreas asinar hücrelerinin, radyoaktif amino asitlerle muamele edilmesinden (deneyin "iz" bırakma aşaması) kısa bir süre sonra, yeni sentezlenen proteinlerin granüllü ER'de saptanması, bu bölgenin salgılanacak proteinlerin sentez yeri olarak tanımlanmasını sağladı. Hücreler daha sonra radyoaktif olmayan amino asitleri içeren ortamda bekletildiğinde (deneyin iz sürme aşaması) radyoaktif işaretli proteinlerin Golgi aygıtına geçtiği, daha uzun izleme sonucunda da, işaretli proteinler Golgi'den hücre zar yüzeyine, zar kaynaşması yoluyla içeriklerini hücre dışına aktaran **salgı vezikülleri** aracılığıyla taşındığı gösterilmiştir.

Video 11.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v11.1
Salgı Yolağında Taşınma
Proteinler ER'den Golgi'ye, Golgi'den plazma zarına taşınırlar.

Bu deneyler ile salgılanan proteinlerin izledikleri yol, **salgı yolağı:** granüllü ER → Golgi → salgı vezikülleri → hücre dışı olarak tanımlanmış oldu. İleri çalışmalar bu deney sonuçlarını detaylandırmış ve bu yolağın sadece salgılanacak proteinler ile sınırlı olmadığını göstermiştir. Bu yolağın belli bölümleri farklı hücresel bölmelere hedeflenmiş proteinler tarafından da kullanılmaktadır. Plazma zarı ve lizozom proteinleri de, granüllü ER'den Golgi'ye, oradan da son hedeflerine iletilirler. Yine diğer bazı proteinler, salgı yolunun ilk basamaklarını geçtikten sonra, işlev görecekleri ER veya Golgi aygıtında tutulurlar.

Proteinlerin ER'ye girmeleri, ökaryot hücrelerde protein trafiğinin önemli bir ayrışım noktasını temsil eder (Şekil 11.3). Salgılanacak veya ER, Golgi aygıtı, lizozomlar, nükleer membran, peroksizom ve plazma zarına hedeflenen ya da, bu organellerin yapısına katılacak proteinler, öncelikle ER'ye hedeflenir. Memeli



Şekil 11.3 Proteinlerin tasnifine genel bakış Yüksek ökaryotik hücrelerde ilk sınflandırılması olan ER'ye hedeflenme ve taşınma, proteinler henüz daha translasyonla sentezlenirken gerçekleşir. Serbest ribozomlarda sentezlenen proteinler ya sitozolde kalırlar ya da nükleus, mitokondri, kloroplast ve peroksizomlara taşınırlar. Buna karşın ER membranına bağlı ribozomlarda sentezlenen proteinler, daha translasyon sürerken ER içine geçerler. Bu proteinler ER lümenine geçiş (translokasyon) sırasında kırpılan ve şekilde kırmızı ile gösterilmiş bir sinyal dizisi içerirler. Bundan sonra proteinler ya ER'de tutulurlar ya da Golgi aparatına, oradan da endozom, lizozom, plazma membranı veya salgı vezikülleri aracılığıyla hücre dışına taşınırlar.

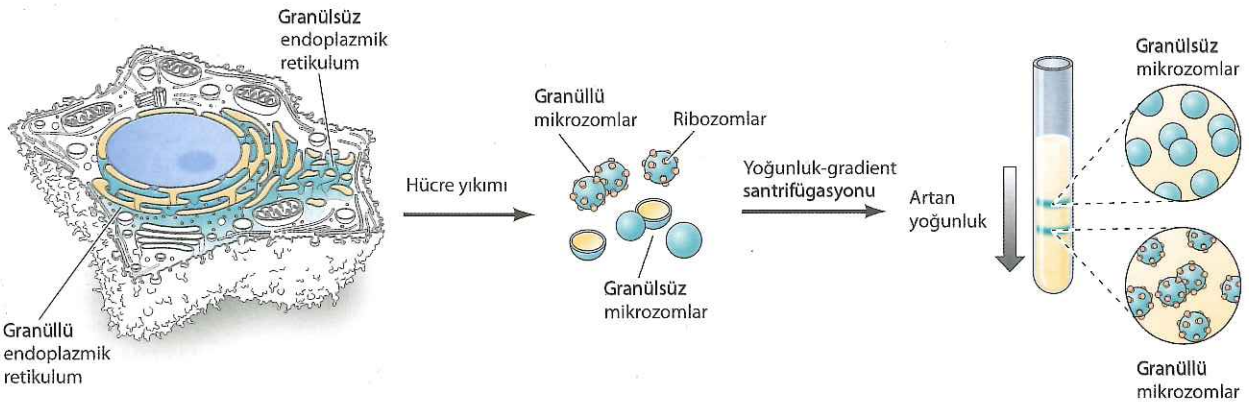
hücrelerinde, çoğu protein zara bağlı ribozomlar üzerinde sentezlenirken ER içine taşınırlar. Buna karşın sitoplazma içinde serbest kalacak veya mitokondri, kloroplast, peroksizom yapısına katılacak proteinler serbest ribozomlarda sentezlenir ve protein sentezi bittiğinde sitoplazma içine bırakılırlar.

Proteinlerin endoplazmik retikuluma hedeflenmesi

Proteinler, ER'ye bağlı ribozomlar üzerinde sentezleri sürerken ER içine taşınabildikleri gibi (translasyon-sırasında-yer değiştirme: *cotranslational translocation*), sitozoldeki serbest ribozomlar üzerinde sentez tamamlandıktan sonra da ER içine alınabilirler (translasyon-sonrası-yer değiştirme: *post-translational translocation*). Memeli hücrelerinde çoğu protein ER'ye translasyon-sırasında girerken, mayada hem translasyon-sırasında, hem de translasyon-sonrası yollar kullanılır. Translasyon-sırasında aktarım yolunun ilk basamağı, ribozom-mRNA kompoleksinin ER'ye tutunmasıdır. Ribozomlar kendilerinde bulunan bir özellikten dolayı değil, sentezlenen polipeptid zincirindeki dizilerle ER'ye hedeflenirler. Serbest ve zara bağlı ribozomlar işlevsel olarak birbirlerinden farksızdır ve protein sentezi genellikle sitozolde serbest olarak bulunan ribozomlardan başlar. Salgılanacak proteinlerin sentezlendiği ribozomlar, uzayan polipeptid zincirinin amino ucunda bulunan bir **sinyal dizisi** aracılığı ile ER'ye hedeflenirler. Bu sinyal dizileri hidrofobik amino asitlerden oluşan kısa diziler olup, ER lümenine aktarım sırasında polipeptid zincirinden kesilerek uzaklaştırılırlar.

Animasyon 11.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a11.1
Salgılanacak Proteinlerin Translasyon Sırasında (Ko-Translasyonel) ER'ye Hedeflenmesi Memelilerde proteinler temel olarak ko-translasyonel bir yolakla ER içine geçerler. ER içine geçişin gerçekleşmesi, yeni sentezlenen proteinin ucunda bulunan bir sinyal dizisine bağımlıdır.

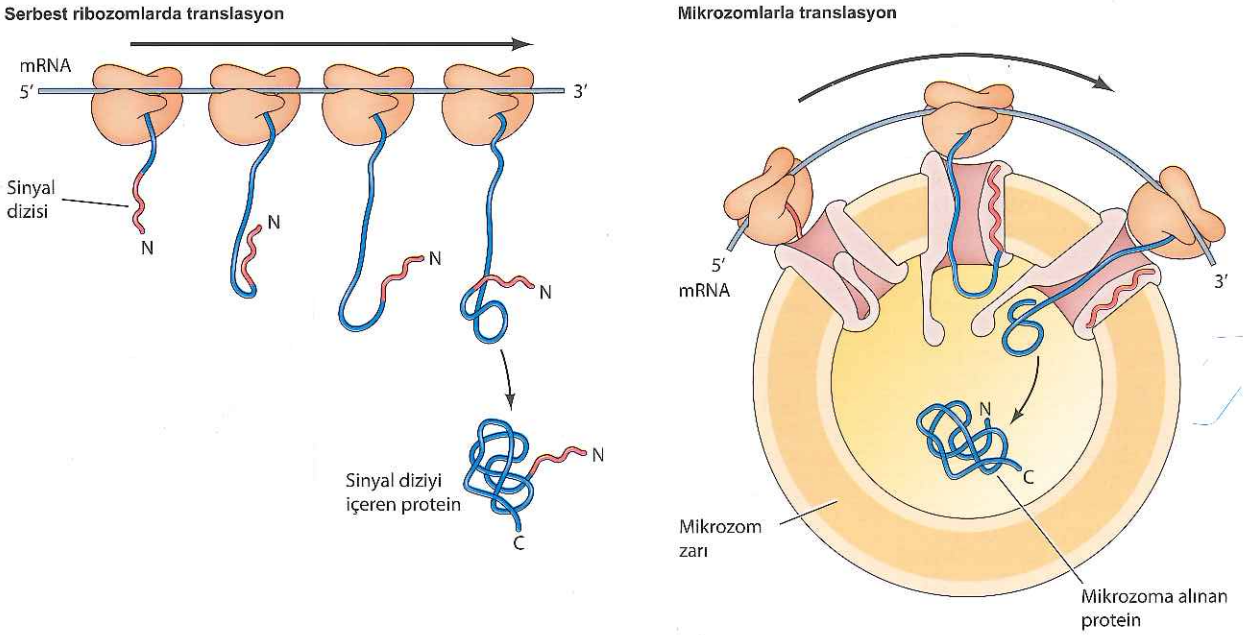
Proteinlerin hücre içindeki doğru yerleşim bölgelerine hedeflenmelerinde sinyal dizilerinin oynadığı rol ilk olarak, salgılanan proteinlerin ER içerisine alımı üzerine yapılan deneylerle gösterilmiştir. Bu deneylerde, hücre özütünden yoğunluk-gradient santrifügasyonu ile ayrıştırılan granüllü ER'nin *vitro* preparasyonları kullanılmıştır (Şekil 11.4). Hücreler parçalandığında, ER **mikrozom** adı verilen küçük veziküllere ayrılır. Granüllü ER'nin oluşturduğu veziküller ribozomlarla kaplı olmaları nedeniyle, granülsüz ER veya diğer



Şekil 11.4 Granüllü ER izolasyonu Hücreler parçalandığında ER mikrozom adı verilen fragmanlara ayrılır. Granüllü ER'den köken alan mikrozomların (granüllü mikrozom) dış yüzeyi ribozomlarla kaplıdır. Ribozomlar büyük miktarlarda RNA içerdiğinden granülsüz mikrozomlardan daha yoğundur ve yoğunluk gradient santrifügasyonu ile izole edilirler (Bölüm 1'de tartışılmıştır).

zarlardan (örn., plazma zarı) oluşan benzer veziküllerden ayrılabilir. Özellikle, ribozomlarda bulunan büyük miktardaki RNA'lar, tutundukları veziküllerin yoğunluğunu artırırlar. Bu yoğunluk farkı, granüllü ER'den (granüllü mikrozomlardan) oluşan veziküllerin, yoğunluk-gradienti denge santrifügasyonu ile ayrıştırılmasına olanak sağlar.

Günter Blobel ve David Sabatini 1971 yılında ilk olarak, ribozomlardaki ER'ye tutunma sinyalinin, sentezlenen polipeptid zincirinin amino ucundaki bir amino asit dizisi olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu hipotez, immünglobulin gibi salgılanan proteinleri kodlayan mRNA'ların, *in vitro* translasyonu ile desteklenmiştir (**Şekil 11.5**). Salgılanacak bir proteini kodlayan mRNA'nın, serbest ribozomlar üzerindeki *in vitro* translasyonu sonucunda sentezlenen protein, normal salgılanacak proteinden biraz daha büyüktür. Deney sistemine mikrozomların eklenmesiyle, *in vitro* ortamda sentezlenen protein, mikrozom içeriğine katılır ve kesilerek doğru büyüklüğe erişir. Bu deneyler, amino uçtaki öncü dizinin, polipeptid zincirini mikrozomlara hedeflediğini ve bu dizinin daha sonra mikrozomal bir proteaz tarafından kesildiğini ileri süren sinyal hipotezinin detaylandırılmasına ön ayak olmuştur. Normalde salgılanmayan bir proteine eklenen sinyal dizisinin, rekombinant proteini ER'ye hedefleyip, yapısına katması için yeterli olduğunu gösteren rekombinant DNA deneyleri gibi, daha sonraki çalışmalarda elde edilen yeni veriler de bu hipotezi desteklemiştir.



Şekil 11.5 Salgı proteinlerinin mikrozom yapısına katılımı Salgı proteinleri, amino (N) terminallerinde bulunan ve translasyon sürerken polipeptid zincirinin ER'ye geçişi sırasında kırpılarak uzaklaştırılan, bir sinyal dizisi vasıtasıyla ER'ye hedeflenirler. Bu olgu, serbest ribozomlarda sentezlenen salgı proteinlerinin sinyal dizilerini hala barındırdıkları, dolayısıyla normalde salgılanan proteinlerden biraz daha büyük olduklarını bulgulayan deneylerle gösterilmiştir. Bu deney sistemlerine mikrozomlar eklendiğinde uzayan polipeptid zincirleri mikrozomların yapısına katılmış ve sinyal dizilerinin proteolitik kesim ile uzaklaştırıldığı görülmüştür.

Anahtar Deney

Sinyal Hipotezi

Transfer of Proteins Across Membranes. I. Presence of Proteolytically Processed and Unprocessed Nascent Immunoglobulin Light Chains on Membrane-Bound Ribosomes of Murine Myeloma

Günter Blobel and Bernhard Dobberstein

Rockefeller University, New York

***Journal of Cell Biology*, 1975, Volume 67, pages 835-851**

Bağlam

Spesifik polipeptid zincirleri, ilgili membran yapılarından nasıl aktarılır? 1950 ve 1960'lardaki çalışmalar, salgılanan proteinlerin zara bağlı ribozomlarda sentezlendiğini ve sentez sırasında zardan lümen içine transfer edildiğini göstermiştir. Ancak, bu bulgular salgılanan proteinlerin sentezlendiği ribozomlar zara bağlanırken, sitozolik proteinlerin sentezlendiği ribozomların neden zara bağlanmadıklarını açıklamamaktadır. Bu farklılığı açıklayacak bir hipotez ilk olarak 1971'de Günter Blobel ve David Sabatini tarafından ortaya konulmuştur. O zaman öne sürdükleri hipoteze göre; (1) zara bağlı ribozomlarda okunacak olan mRNA'ların başlama bölgelerinin hemen 3′ tarafında, özel bir kodon seti bulunur, (2) bu kodonların proteine çevrilmesi, uzayan polipeptid zincirinin amino ucunda özel bir sinyal dizisi oluşturur, (3) sinyal dizi polipeptidin zara bağlanmasını tetikler. Blobel ve Dobberstein 1975'de bu fikri destekleyen bir dizi önemli deneyi yayınladılar. Buna ek olarak, sinyal hipotezi adı altında daha önceki hipotezin yeni, daha detaylandırılmış bir versiyonunu ileri sürdüler.

Deneyler

Miyelomlar, B lenfositlerin kanserleri olup, aktif olarak immünglobulin salgıladıklarından, salgılanan proteinlerin çalışılması için iyi bir model oluştururlar. Cesar Milstein'in laboratuvarında daha önce yapılan çalışmalarda, *in vitro* translasyon koşullarında immünglobulin hafif zincir mRNA'sından sentezlenen proteinlerin amino ucunda, salgılanan hafif zincirlerde bulunmayan 20 amino asitlik bir dizinin varlığını gösterdiler. Bu bulgu, bu amino asitlerin, ribozomların zara bağlanmasını yönettikleri öngörüsünün ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bu fikri denemek için Blobel ve Dobberstein, miyelom hücreleri kullanarak zara bağlı ribozomlarda hafif zincirin sentezini incelediler.

Önceki çalışmalarda gösterildiği gibi hafif zincir mRNA'sının serbest ribozomlardaki *in vitro* translasyonu, salgılanan hafif zincir proteinlerinden daha büyük bir protein ile sonuçlandığını gördüler (şekle bakınız). Buna karşılık, miyelom hücrelerinin zara bağlı ribozomlarındaki mRNA translasyonu sonucu oluşan proteinin, salgılanan hafif zincir ile aynı büyüklükte olduğu gösterildi. Buna ek olarak, mikrozomlara bağlı ribozomlarda sentezlenen hafif zincirlerin proteazlara karşı dirençli olduğu izlendi ki, bu da hafif zincirlerin mikrozom içerisine transfer edildiği görüşünü desteklemektedir.

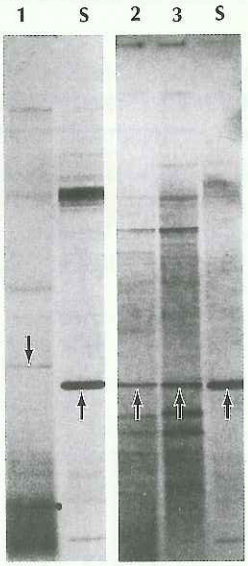
Bu sonuçlar, translasyon sırasında uzayan polipeptid zincirlerinin, ER zarından ER lümenine geçerken, amino uçlarında bulunan sinyal dizisinin bir mikrozomal proteaz tarafından kesildiğini göstermektedir. Deney sonuçlarının yorumu sinyal hipotezinin daha detaylandırılmış haliyle gerçekleşti. Blobel ve Dobberstein tarafından belirtildiği gibi "sinyal hipotezinin temeli, mRNA'ların başlama kodonlarının hemen sağında, translasyon sonrası polipeptid zincirinin bir zardan geçmesini sağlayan, özel bir kodon dizisinin varlığıdır."

Etki

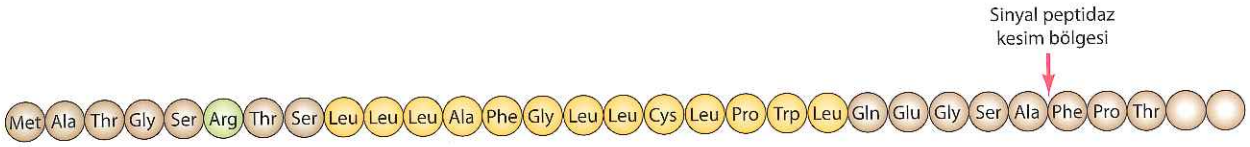
Proteinlerin zarlardan seçici olarak geçişi, ökaryot hücrelerde zarla çevrili organellerin devamlılığı açısından önemlidir. Bu organellerin özgüllüklerini korumaları için, proteinlerin özgül

Günter Blobel

olarak, uygun zarlardan geçişi sağlanmalıdır. Sinyal hipotezi bu fenomenin anlaşılmasına temel sağlamıştır. Bu temel model, sadece salgılanan proteinlerin ER içine transferini açıklamakla kalmadı, bunun yanında, genel olarak proteinlerin tüm diğer zarla çevrili bölmelere hedeflenmelerinin açıklanması için de bir çerçeve sağlayarak hücre biyolojisinin tüm alanlarını etkiledi.

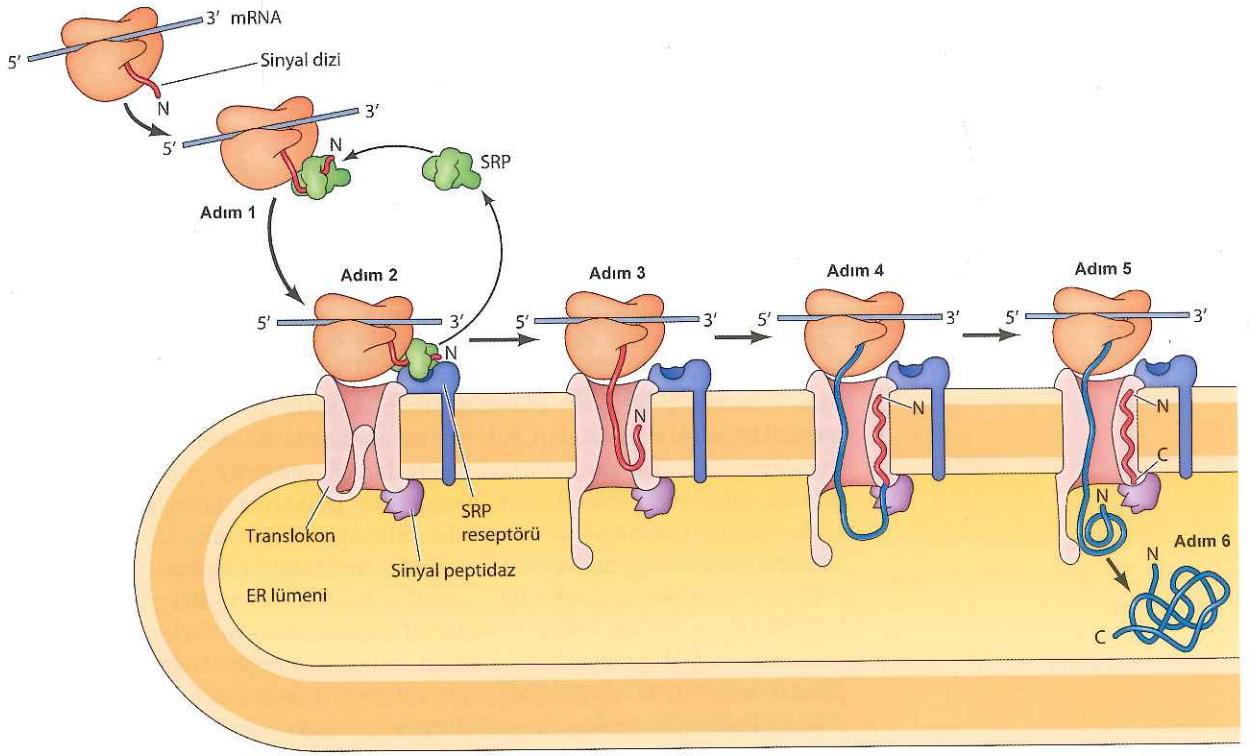


İmmünglobulin hafif zincir mRNA'sının serbest ribozomlardaki *in vitro* translasyon ürünü (kuyu 1), jel elektroforezinde, salgılanan hafif zincirlerden (kuyu S) daha yavaş yürür. Buna karşılık, zara bağlı ribozomlarda *in vitro* sentezlenen hafif zincir (kuyu 2), salgılanan hafif zincirler ile aynı büyüklüktedir. Buna ek olarak, zara bağlı ribozomlarda *in vitro* sentezlenen ürünlerin proteaz sindiriminden etkilenmedikleri gözlenmektedir (kuyu 3) ki, bu da mikrozom içine geçerek proteazlardan korunduklarını düşündürmektedir.

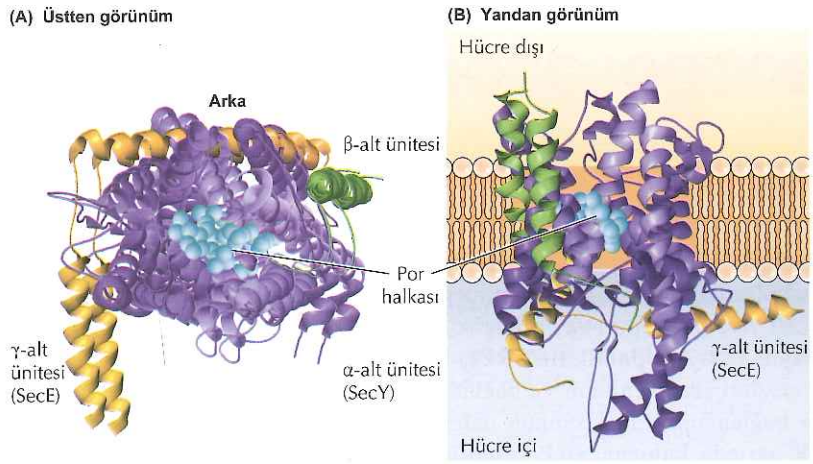


Şekil 11.6 Büyüme hormonunun sinyal dizisi Çoğu sinyal dizisi (örn., büyüme hormonundaki gibi) bazik kalıntıları (örn., arjinin, yeşille gösterilmiştir) takip eden bir dizi hidrofobik amino asit (sarıyla gösterilmiştir) barındırır.

Salgılanacak proteinleri sentezi sırasında ER'ye hedefleyen mekanizma (ko-translasyonel yolak) bugün oldukça iyi bilinmektedir. Sinyal dizisi, yaklaşık 15-40 amino asit uzunluğunda olup, 7-12 hidrofobik amino asitlik bir bölge içerir ve genellikle polipeptid zincirinin amino ucunda yer alır (Şekil 11.6). Altı polipeptid ve bir küçük sitoplazmik RNA'dan **(SRP RNA)** oluşan **sinyal tanıyan partikül (SRP),** bu sinyal dizilerini, henüz ribozomlarda sentezleri sürerken tanır ve bağlanır. SRP, sinyal dizisi ile birlikte ribozoma da bağlanarak translasyonun daha fazla ilerlemesini durdurur ve granüllü ER zarında bulunan **SRP reseptörüne** bağlanarak tüm kompleksin (SRP, ribozom, uzayan polipeptid zinciri) ER'a hedeflenmesini sağlar (Şekil 11.7). Reseptöre bağlanma, SRP'nin ribozomdan ve uzayan peptid zincirinin sinyal



Şekil 11.7 Salgı proteinlerinin ER'ye translasyon sırasında hedeflenmesi 1. Adım: Sinyal dizisi ribozomda sentezlenir sentezlenmez, sinyal tanıyan partikül (SRP) tarafından tanınır ve bağlanır. 2. Adım: SRP, bağlandığı polipeptid zincirini ER membranına yönlendirir ve burada SRP reseptörüne bağlanır. 3. Adım: SRP serbestleşir, ribozom translokona bağlanır ve sinyal dizisinin kanala sokulması translokonun açılmasını sağlar. 4. Adım: Translasyon devam eder ve sinyal dizisi sinyal peptidaz tarafından uzaklaştırılır. 5. Adım: Devam eden translasyon sırasında uzayan polipeptid zinciri membranın öteki tarafına, ER lümenine nakledilir. 6. Adım: Sentezi tamamlanmış polipeptid zinciri ER lümeninde serbestleşir.

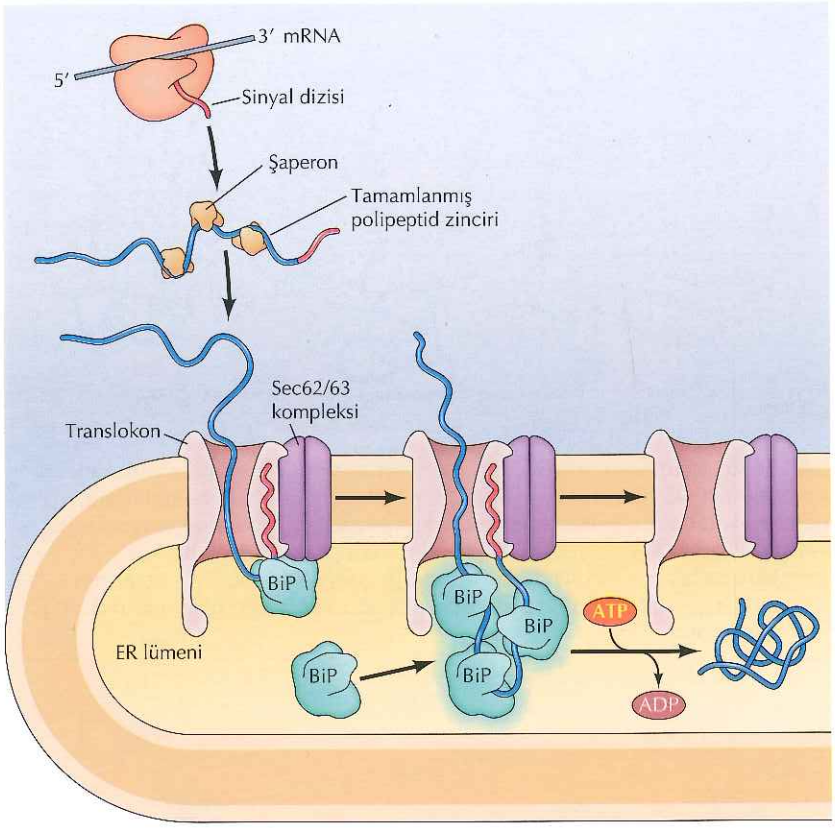


Şekil 11.8 Translokon yapısı Translokon yeşil, mor ve sarı ile gösterilmiş 3 alt birimden oluşmuştur. (A) Sitozolden bakıldığında translokon kanalı içerisindaki tıkacı gösteren bir kesit (B) ER membranına katılmış bir translokonun yandan görünüşü (E. Park ve T. A. Rapoport, 2012. *Ann. Rev. Biophys.* 41:21.)

dizisinden ayrılmasını sağlar. Bu aşamada ribozom ER zarında bulunan bir protein translokasyon kompleksine bağlanır ve sinyal dizisi bir zar kanalının **-translokon-** içine sokulur.

ER zarından proteinlerin translokasyon süreci ile ilgili anlayışımızı geliştiren anahtar bulgular, 2004 yılında Tom Rapoport ve arkadaşlarının translokon yapısını tanımlamalarıyla sağlanmıştır. ER'deki translokonlar, hem maya hem de memeli hücrelerinde Sec6l proteinleri adı verilen üç transmembran proteinden oluşmuş komplekslerdir (Şekil 11.8). Maya ve memeli translokon proteinleri, bakteri plazma zarında salgılanan polipeptidlerin translokasyonundan sorumlu proteinlere büyük benzerlik gösterir; ki bu da protein salgı mekanizmalarının ökaryot ve prokaryot hücreler arasındaki dikkat çekici korunumuna işaret eder. Sinyal dizisinin translokon içerisine sokulması kanalı kapatan bir tıkacın uzaklaştırılmasıyla sağlanır. Ribozomun SRP'den translokona aktarılması, baskılanmış olan çevrimin (translasyonun) kaldığı yerden devam etmesini sağlar ve uzayan polipeptid zinciri doğrudan translokon kanalı yoluyla ER zarından iç boşluğa geçer. Diğer bir ifadeyle protein sentez sürecinin kendisi polipeptid zincirlerinin translokondan geçişini sağlamaktadır. Translokasyon gerçekleştikçe, sinyal dizisi bir **sinyal peptidaz** enzimi tarafından kesilir ve polipeptid ER lümenine bırakılır.

Mayadaki pek çok protein gibi, memelilerdeki bazı proteinler de, ER zarına bağlı ribozomlar ile sentezlenirken değil, protein sentezi tamamlandıktan sonra ER'ye hedeflenirler (translasyon sonrası yer değişimi). Bu proteinler sitozoldeki serbest ribozomlar ile sentezlenir ve translasyon-sonrasında ER'ye aktarılmaları için SRP gerekli değildir. Bunun yerine, polipeptidin sinyal dizileri ER üzerindeki translokonlarla

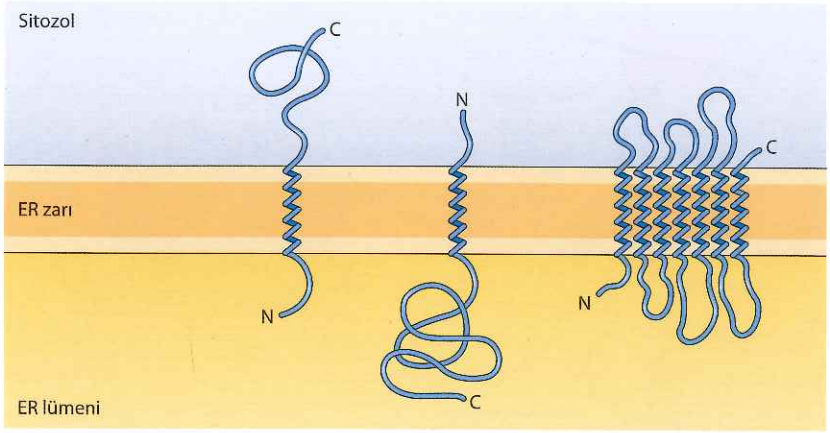


Şekil 11.9 Proteinlerin ER içerisine translasyon-sonrası-yer değiştirmesi ER içerisine translasyon sonrasında alınacak proteinler, serbest ribozomlar üzerinde sentezlenir ve sitozolik şaperonlar tarafından katlanmamış konformasyonda tutulur. Sinyal dizileri, ER membranında bulunan Sec62/63 kompleksi tarafından tanınır ve bu kompleks tarafından translokona sokulur. Sec63 aynı zamanda şaperon BiP proteini ile de ilişkidedir. Çok sayıda BiP proteininin bağlanması ve ATP hidrolizi ile serbestleşmesi polipeptid zincirinin ER içerisine translokasyonu için gerekli enerjiyi sağlar.

ilişkili farklı reseptör proteinler (Sec62/63 kompleksi) tarafından tanınır (Şekil 11.9). Sitozolde bulunan Hsp70 ve Hsp40 şaperonları, polipeptid zincirlerini katlanmamış konformasyonda tutmak için gereklidir. Böylece bu proteinler translokona girebilir. ER'de bulunan bir başka Hsp70 şaperonu (BiP) da polipeptid zincirini kanaldan ER içine çekmek için gereklidir. Öyle gözüküyor ki, proteinlerin translasyon-sonrası-yer değişimlerini sağlamak için polipeptidlerin BiP'e bağlanmaları gerekirken; uzayan polipeptid zincirlerinin translasyon-sırasında translokasyonu doğrudan protein sentez süreci tarafından gerçekleştirilmektedir.

Proteinlerin ER zarına katılması

Hücreden salgılanmak veya ER lümeni, Golgi aygıtı veya lizozomlarda yerleşmek üzere hedeflenen proteinler yukarıda tarif edildiği gibi ER

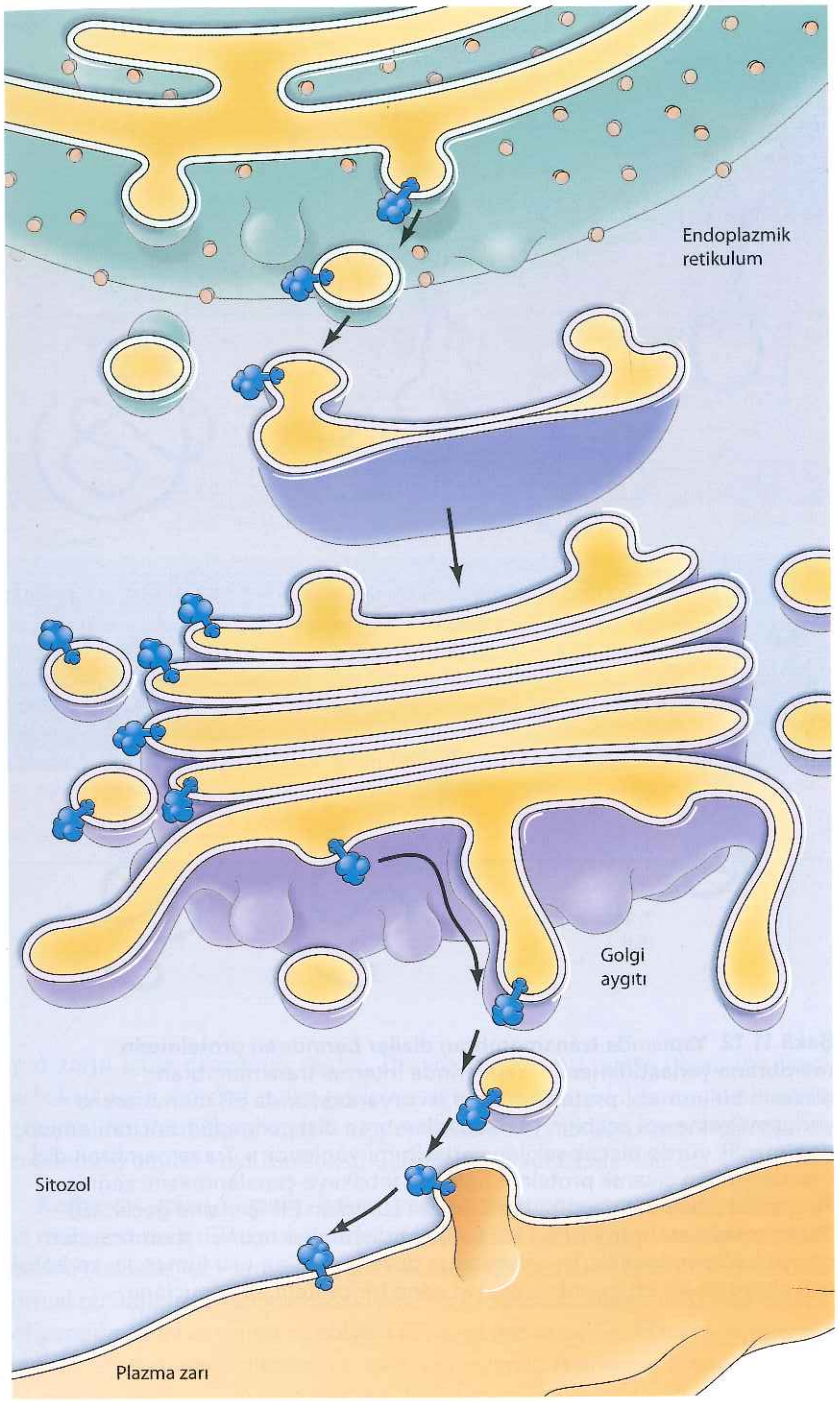


Şekil 11.10 Membran proteinlerinin oryantasyonu İntegral membran proteinleri 20-25 hidrofobik amino asitten oluşan α-helikal bölgeleriyle membranı kat eder. α–Heliks bölgesi membrana değişik oryantasyonlarda yerleşebilir. Solda ve ortadaki iki protein, membranı sadece bir kez geçmekle beraber sitozolik yüzde amino (N) veya karboksil (C) uçlarının olmasıyla ayrılırlar. Sağda ise membranı çoklu kez geçen bir protein örneği bulunmaktadır.

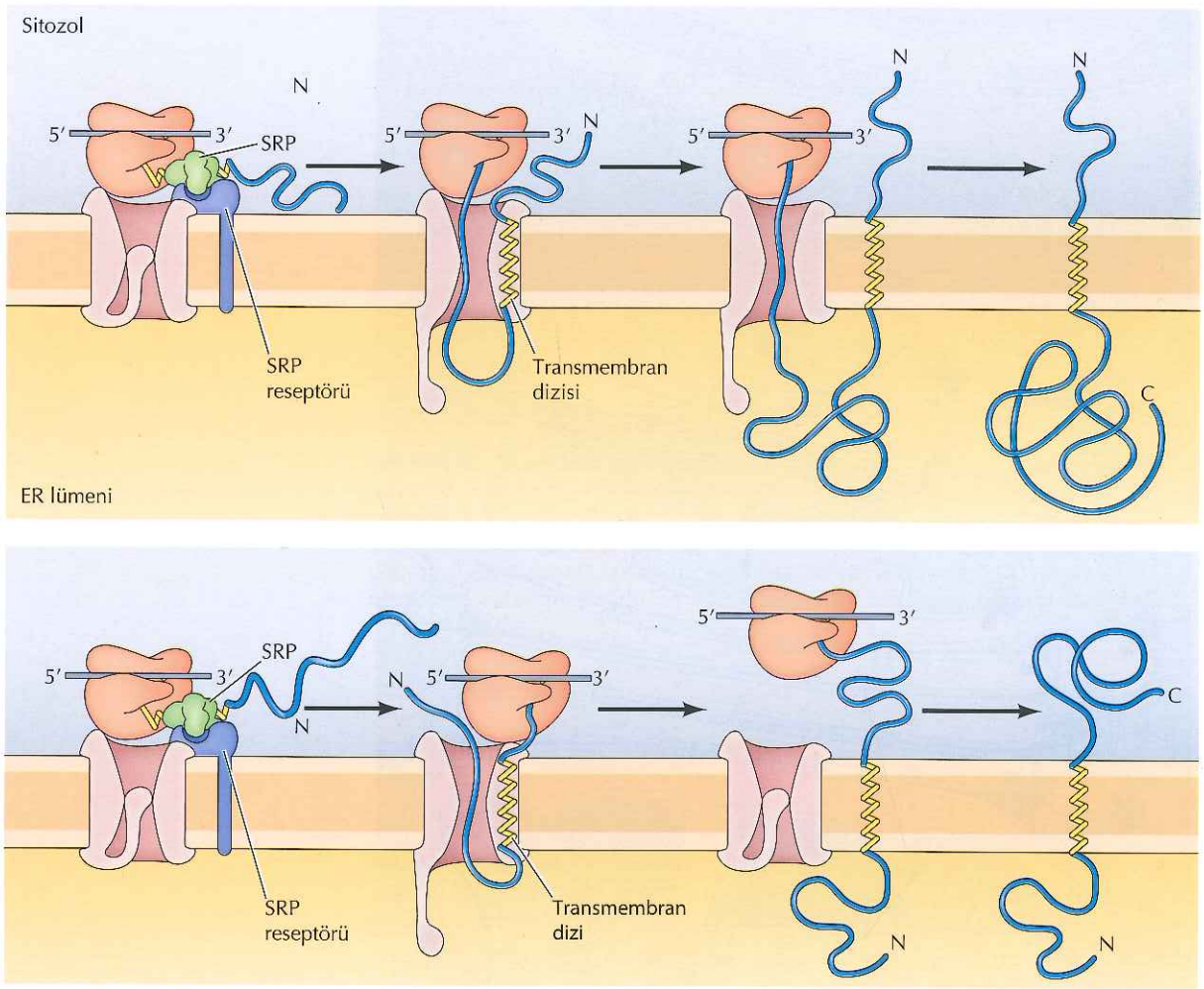
zarından geçerler ve ER lümeninde serbest kalırlar. Ancak, plazma zarına veya diğer bölmelerin zar yapılarına katılacak olan proteinler, ER lümenine geçmek yerine, ER zar yapısına katılır. Bu aşamadan sonra hedef yerlerine salgı proteinleri ile aynı yolu izleyerek giderler: ER → Golgi → plazma zarı veya endozom → lizozom. Ancak bu moleküller, son hedeflerine çözünmüş proteinler olarak değil, zar bileşenleri olarak transfer edilirler.

İntegral zar proteinleri, fosfolipid çift-tabakayı boydan boya kat eden, hidrofobik bölgeleri diziler ile zara gömülürler (bkz. Şekil 2.34). Bu proteinlerin zarı geçen bölümleri genellikle 20-25 hidrofobik amino asitten oluşan α-sarmal yapısındadır, α-sarmal yapısı, peptid bağlar arasındaki hidrojen bağı oluşumunu en üst düzeye çıkarır ve hidrofobik amino asitlerin yan zincirleri, çift tabakadaki yağ asitlerinin kuyrukları ile ilişkiye girer. Ancak değişik integral zar proteinlerinin zara gömülme şekilleri farklıdır (**Şekil 11.10**). Örneğin bazı integral zar proteinleri zarı bir kez geçerken, diğerlerinin çoklu geçiş bölgeleri bulunabilir. Buna ek olarak, bazı proteinlerin amino uçları sitozolik tarafa bakar, diğerlerinin ise karboksil uçları sitozole dönüktür. ER, Golgi, plazma zarı ve lizozomlardaki bu proteinlerin yönlenimi uzayan polipeptid zincirinin ER içine aktarım sürecinde belirlenir. ER lümeni topolojik olarak hücre dışına karşılık gelmektedir. Plazma zar proteinlerinin hücre dışına bakan bölümleri, polipeptid zincirinin ER lümenine geçen bölümlerine karşılık gelir (**Şekil 11.11**).

Pek çok protein yukarıda tarif edilen SRP/Sec61 ko-translasyonel yolak ile ER zar yapısına katılır. Proteinlerin çoğu, SRP tarafından tanınarak translokona getirilen internal transmembran diziler ile ER zarına doğrudan

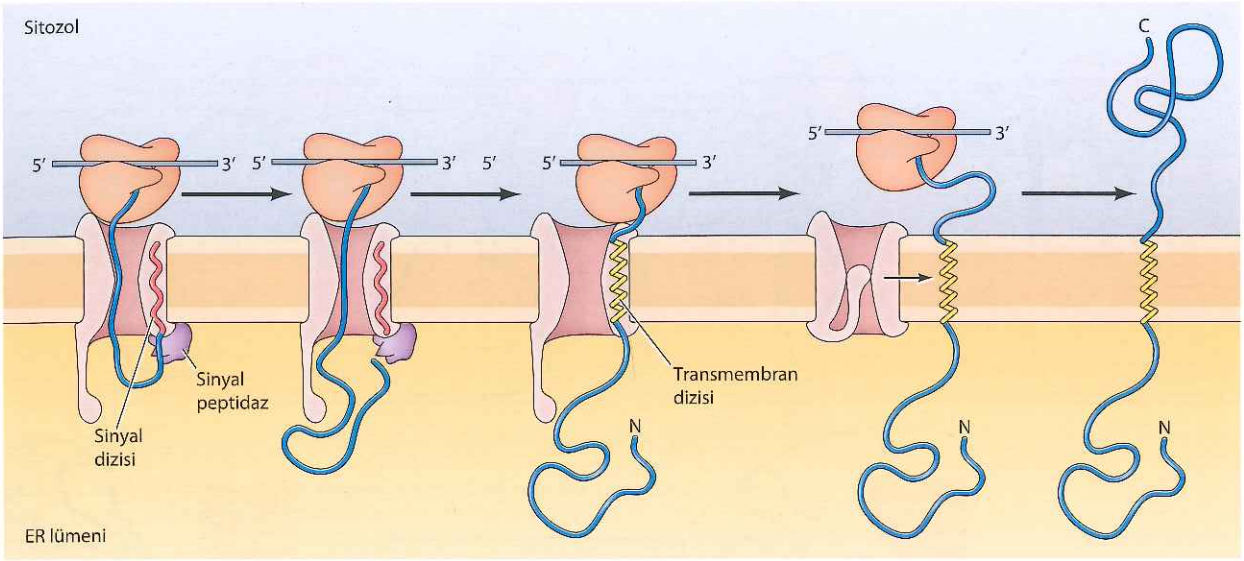


Şekil 11.11 Salgı yolağının topolojisi Endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtının lümenleri topolojik olarak hücre dışına karşılık gelir. Sonuç olarak polipeptid zincirlerinin ER içine bakan bölgeleri, plazma membranına taşınması sonrasında hücre dışında yerleşim gösterecektir.



Şekil 11.12 Yapısında transmembran diziler barındıran proteinlerin membrana yerleştirilmesi Yapılarında internal transmembran dizilerin bulunması, proteinlerin her iki oryantasyonda ER membranına yerleşmelerine yol açabilir. (A) Transmembran dizi polipeptid zincirini amino uç sitozolik yüzde olacak şekilde yerleşimini yönlendirir. Transmembran dizi translokondan çıkarak proteinin lipid çift tabakaya çapalanmasını sağlar. Polipeptid zincirinin devamı translasyon sürerken ER içerisine geçer. (B) Başka transmembran dizileri ise polipeptidin amino ucunun membrandan geçişini yönlendirebilir. Translasyonun devamı, amino ucu lümende, karboksil ucu sitozolde ve ER membranını kat eden bir protein ile sonuçlanır.

yerleştirilirler, fakat bu diziler sinyal peptidazlar tarafından kesilerek uzaklaştırılmaz (Şekil 11.12). Bunun yerine, bu transmembran α heliksler translokondan lateral yönde çıkarak proteini ER zarının içine çapalar. Protein yapısındaki bu hidrofobik transmembran diziler traslokon için bir değişiklik sinyali oluşturarak, translokon yapısındaki transmembran heliksin açılmasını ve proteinin hidrofobik transmembran domaininin translokondan çift katlı

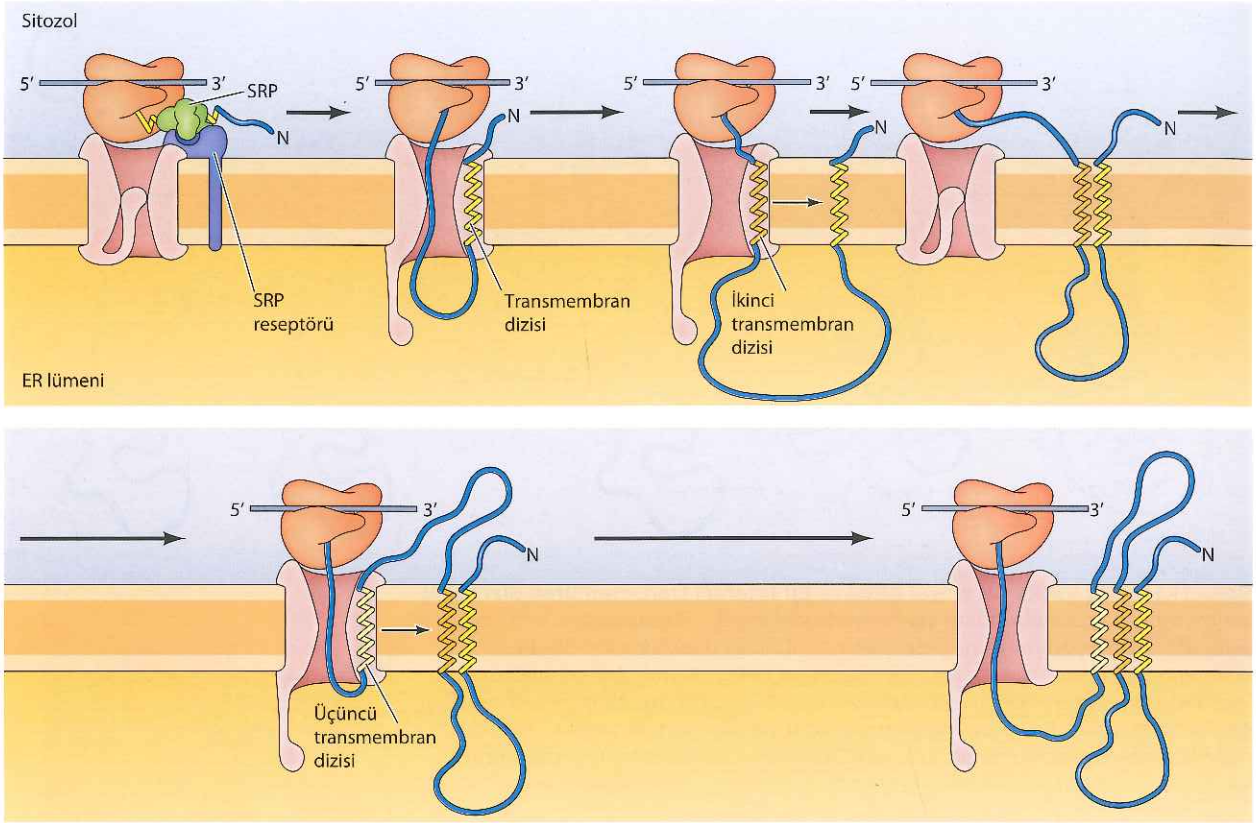


Şekil 11.13 Kırpılabilir bir sinyal dizisi ve bir İnternal transmembran dizi sahip bir membran proteinin hücre zarına yerleştirilmesi Translasyon sırasında polipeptid zinciri membranı geçerken sinyal dizisi uzaklaştırılır. Böylece polipeptid zincirinin amino ucu ER lümenine bakar. Ancak, translokonun internal transmembran dizisini tanımasıyla polipeptid zincirinin membrandan geçişi durdurulur. Bu, proteinin translokonu yandan terk etmesine ve ER membranına çapalanmasına izin verir. Translasyonun devamıyla membranı kat eden ve karboksil ucu sitozolik yüzde olan bir protein oluşur.

lipid zarın içine çıkmasını sağlar. Burada önemli bir nokta da amino veya karboksil ucun translokondan geçişini sağlayabilecek şekilde sinyal dizisinin yerleşimidir. Bu mekanizmayla sinyal dizisinin oryantasyonuna bağlı olarak proteinlerin amino veya karboksil uçları sitozol tarafında olabilir.

Karboksil uçları sitozole bakan bazı transmembran proteinler, alternatif bir mekanizma ile ER zarına yerleşirler (**Şekil 11.13**). Bu proteinler, protein çevrimi (translasyon) sırasında translokondan ER içerisine aktarılırken kesilen, normal bir amino-ucu sinyal dizisi içerirler. Protein translasyonu devam ettikçe polipeptidin uzayan amino uç bölgesi ER içerisine aktarılır. Aktarım polipeptid zincirinin ortasında bulunan ve zarı kat ederek (transmembran özellikte) polipeptid zincirini zara sabitleyen bir α-sarmal yapısıyla durdurulur. Bu α-sarmal yapının translokondan ayrılıp zara yerleşmesiyle polipeptid zincirinin zardan daha fazla geçişi engellenir ve zincirin karboksil ucu sitozolde kalır. Bu mekanizma özellikle ER içerisine büyük amino uç bölgelerin yerleştirilen proteinler tarafından kullanılır.

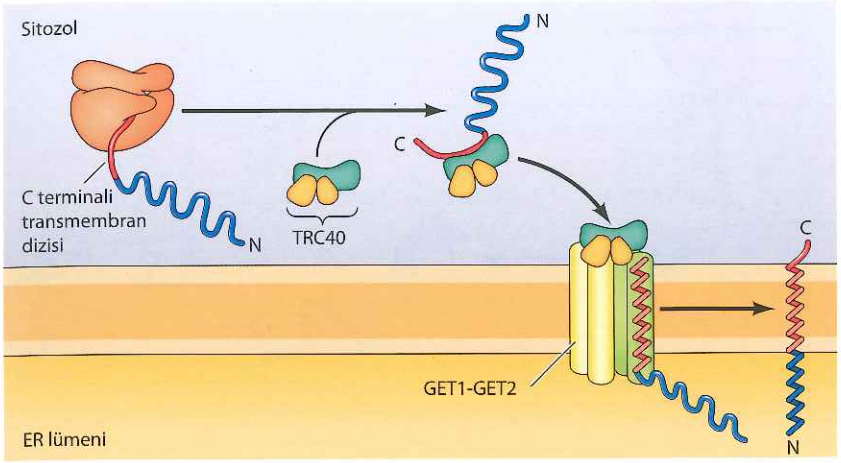
Proteinlerin membranı çok defa kat edecek şekilde yerleşimleri, protein üzerindeki değişik oryantasyonlardaki ardışık transmembran dizilerin varlığının bir sonucudur. Örneğin, bir iç transmembran dizisinin varlığı, amino



Şekil 11.14 Membranı birçok kez geçen bir proteinin yerleştirilmesi Bu örnekte internal transmembran dizisinin varlığı, amino ucu membranın sitozolik yüzünde yerleşik bir polipeptid zinciri ile sonuçlanır. Tranlasyon, ikinci bir transmembran dizisiyle karşılaşana kadar devam eder. Bu durum ER lümeni içerisinde polipeptid zincirinin bir ilmek (*loop*) oluşturmasına neden olur. Sitozolde translasyon devam eder. Üçüncü bir transmembran dizi kanalı tekrar açarak polipeptid zincirinin kanala tekrar sokulmasını ve bu sefer sitozolde bir ilmek (*loop*) oluşumuna yol açar. Çok sayıda membranı geçen bölgeleri olan proteinlerin hücre zarına yerleşimi, bu sürecin tekrarlarıyla gerçekleştirilir.

ucu sitozolik yüze bakan bir polipeptidin zara katılması ile sonuçlanabilir (Şekil 11.14). Sonrasında translasyonun devam etmesi, polipeptid zinciri sentezini ER lümeninin içine doğru yönlendirir. İkinci bir transmembran bölgenin varlığı, polipeptidin ER lümeninde bir ilmik oluşturmasına yol açar, bu arada protein sentezi zarın sitozolik yüzünde devam eder. Üçüncü bir transmembran dizi ile karşılaşılması halinde uzayan polipeptid zinciri bu sefer sitozolik yüzeyde bir başka ilmik oluşturarak tekrar ER'ye gömülür. Bunu, başka transmembran bölgeler takip edebilir ve bu süreç hem lümen tarafında, hem de sitozolik yüzde ilmik yapıları bulunan, zarı çok kez kat eden, proteinlerin oluşumu ile sonuçlanır.

Karboksil ucunda transmembran dizi barındıran bazı proteinler, alternatif bir post-traslasyonel mekanizma ile ER zarına yerleştirilir. Bu proteinlerin karboksi ucunda bulunan transmembran diziler, protein sentezi bitip de polipeptid zincir serbestleşinceye kadar ribozom tarafından maskelendiğinden,



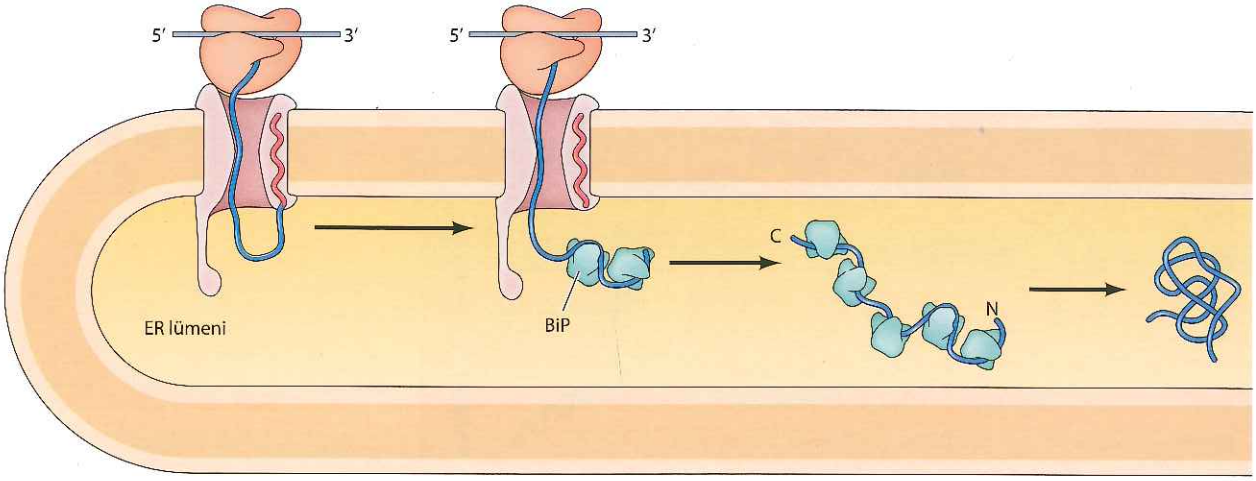
Şekil 11.15 C-ucunda transmembran dizisi bulunan bir proteinin hücre zarına post-translasyonel yerleşimi Polipeptidlerin karboksi uç terminalleri translasyon bitmeden ribozomu terk etmediğinden, C-terminallerinde transmembran dizi barındıran proteinler SRP tarafından tanınamazlar. Bunun yerine bu proteinler, hedefleyici faktör (*targetting factor*) TRC40 tarafından protein sentezi bitiminde tanınarak GET1-GET2 reseptörüne getirilirler. Kısa C-terminal bölgeleri sitozolik yüzde olacak şekilde ER zarına yerleştirilirler.

SRP tarafından tanınamaz. Bunun yerine, protein sentezi bittikten sonra TRC40 veya GET3 olarak adlandırılan özel bir hedefleme faktörü tarafından tanınırlar (Şekil 11.15). TRC40, transmembran proteini ER'ye getirir ve GET1-GET2 reseptörü yoluyla bu proteinler ER zarına yerleşir.

Aşağıda da tartışılacağı gibi, salgı yolağının farklı kompartmanlarına hedeflenen çoğu transmembran protein, hedeflerine taşıyıcı kesecikler (veziküller) içerisinde iletilir. Ancak, ER'nin devamı niteliğinde olan çekirdek zarına hedeflenen proteinler, veziküllerle taşınmak yerine zar tabakaları arasında yatay düzlemde hareket ederler. Son çalışmalar, emerin ve lamin B reseptörü gibi iç çekirdek zarı proteinlerinin (bkz. Bölüm 10) bu bölgeye aktarılmalarını sağlayan özgül transmembran diziler içeridiklerini desteklemektedir. Bu tür proteinler iç çekirdek zarına vardıklarında, burada bulunan laminler veya kromatin gibi çekirdek bileşenleri ile etkileşerek sabitlenirler.

ER'de protein katlanması ve işlemlenmesi

Polipeptid zincirlerinin doğru üç boyutlu yapılarına katlanmaları, polipeptidlerin çoklu alt birime sahip proteinleri oluşturmaları ve protein işlenmesi ile ilgili kovalent modifikasyonlar Bölüm 9'de tartışıldı. Salgı yolağına giren proteinler için bu aşamaların çoğu, ER zarından içeriye aktarılırken veya ER lümeninde gerçekleşir. Bu tür işlenme olaylarından biri, polipeptid zincir ER zarından geçerken gerçekleşen sinyal peptidinin proteolitik kesimidir. Buna ek olarak ER, protein katlanmasının gerçekleştiği, çoklu alt birime sahip proteinlerde alt birimlerin bir araya geldiği, disülfid bağlarının oluştuğu, *N*-bağlı glikozillenmenin gerçekleştiği ve bazı plazma zar proteinlerine glikolipid çapaların eklendiği yerdir. Hatta, lümendeki ER



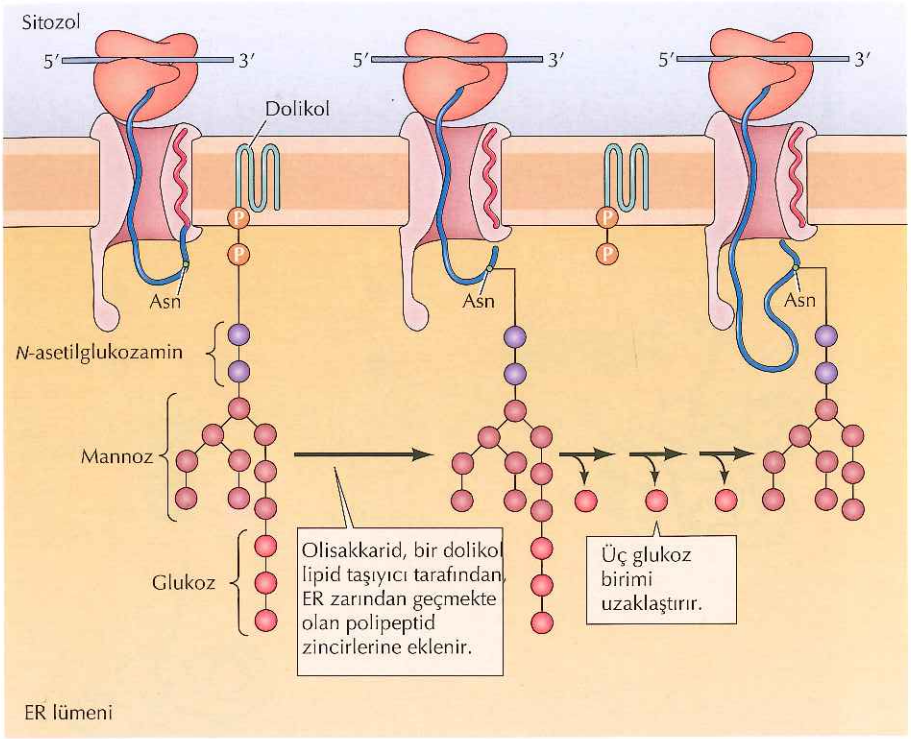
Şekil 11.16 ER içerisinde protein katlanması Moleküler şaperon BiP, polipeptid zinciri ER membranından geçerken ona bağlanır ve ER içerisinde protein katlanması ile alt birimlerin bir araya getirilmesini düzenler.

proteinlerinin birincil işlevi, içeriye yeni alınmış polipeptid zincirlerinin katlanmasında ve bir araya getirilmesinde görev almaktır.

Önceden tartışıldığı gibi, proteinler translasyon sürerken katlanmamış polipeptid zincirleri olarak ER zarından lümen içine aktarılır. Bu polipeptidler katlanmayı düzenleyen moleküler şaperonlar yardımıyla üç boyutlu yapılarına ER içinde katlanırlar (bkz. Bölüm 9). Bir Hsp70 şaperonu olan BiP'in, katlanmamış polipeptid zincirine, zarı geçerken bağlandığı ve sonra protein katlanması ile alt birimlerin birleştirilmesini ER içinde düzenlediği düşünülmektedir (Şekil 11.16). Doğru yapılandırılmış proteinler BiP'den (ve diğer şaperonlardan) ayrılırak Golgi aygıtına aktarılırlar. Normal olmayan bir şekilde katlanmış veya yanlış yapılandırılmış proteinler, ileride tartışılacağı gibi yıkıma yönlendirilir.

Sistein birimlerinin yan zincirleri arasında disülfid bağlarının oluşumu, ER içindeki protein katlanma ve yapılanmasının önemli bir aşamasıdır. Bu bağlar, indirgen bir çevre olan ve sistein amino asitlerini indirgenmiş formda (–SH) tutan sitozolde oluşmaz. ER'deki oksitleyici ortam disülfid bağ (S–S) oluşumunu destekler ve ER'de oluşmuş disülfid bağları, salgılanan ve hücre yüzey yapısında bulunan proteinlerin yapısında önemli rol oynar. Disülfid bağ oluşumu ER lümeninde yerleşik **protein disülfid izomeraz (PDI)** enzimi (bkz. Şekil 9.28) ile gerçekleştirilir.

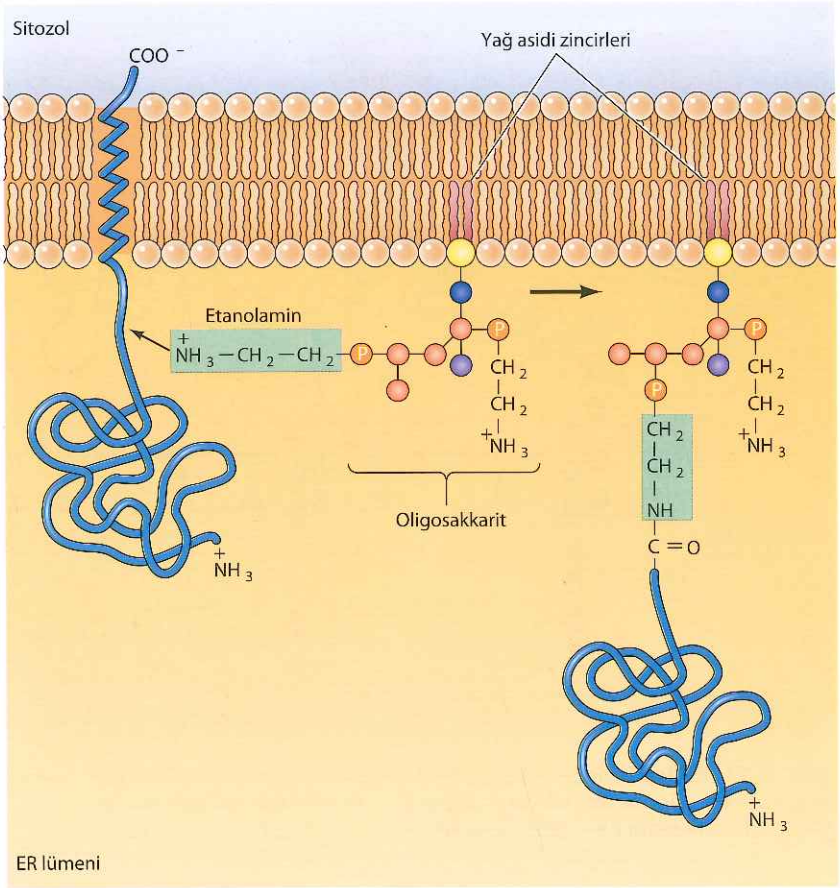
Proteinler ayrıca, translasyonları sürerken ER içinde, bazı özel asparajin birimlerinden glikozillenirler (*N*-bağlı glikozillenme) (Şekil 11.17). Bölüm 9'da (bkz. Şekil 9.33) tartışıldığı gibi, uzayan polipeptid zincirleri ER zarından lümene geçerken asparajin birimlerine 14 şeker biriminden oluşan oligosakkarid birimleri eklenir. Oligosakkarid, ER zarına sabitlenmiş bir lipid



Şekil 11.17 ER içerisinde protein glikolizasyonu Proteinler, ER içerisinden, 14 şekerli bir oligosakkaridin alıcı asparajin (Asn) birimi eklenmesi ile glikozillenir. Protein halen ER içerisindeyken üç glukoz birimi ayrılır.

(dolikol) taşıyıcı üzerinde sentezlenir. Sonra bir bütün olarak zara bağlı bir enzim olan oligosakkarid transferaz tarafından, Asp-X-Ser/Thr ortak dizisindeki asparajin birimine aktarılır. Protein henüz daha ER içindeyken 3 glukoz birimi uzaklaştırılır ve daha ileri modifikasyonlar, protein Golgi aygıtına taşındıktan sonra devam eder (ileride bu bölümde tartışılacak). Glikolizasyon hem ER içerisinde protein agregasyonunun önlenmesinde, hem de salgı yolağında proteinlerin hedeflenmesi için gerekli sinyallerin sağlanmasında rol oynar.

Bazı proteinler plazma zarına transmembran bölgeleriyle değil, glikolipidler aracılığı ile sabitlenir (çapalanır). Yapıları Şekil 9.38'de gösterilen, zara "çapa atabilen" glikolipidler, fosfatidilinositol içerdiklerinden **glikosilfosfatidilinositol (GPI) çapaları** olarak adlandırılırlar. GPI çapaları, ER zarı içinde yapılandırılırlar. Protein sentezinden hemen sonra karboksi terminalde bulunan hidrofobik bir dizi ile zara sabitlenmiş olan bazı proteinlerin hidrofobik C-ucu, GPI çapası ile değiştirilir (**Şekil 11.18**). Böylece bu proteinler zara sadece ilgili glikolipidler sayesinde bağlı kalırlar. Transmembran proteinler gibi, bunlar da hücre yüzeyine salgı yolağı ile zar bileşenleri olarak ulaşırlar. GPI çapasına sahip proteinlerin ER içindeki yönlenimleri, hücrenin dış yüzeyine yerleşeceklerini gösterir. GPI çapası proteinin zar ile olan bağlantısından sorumludur.



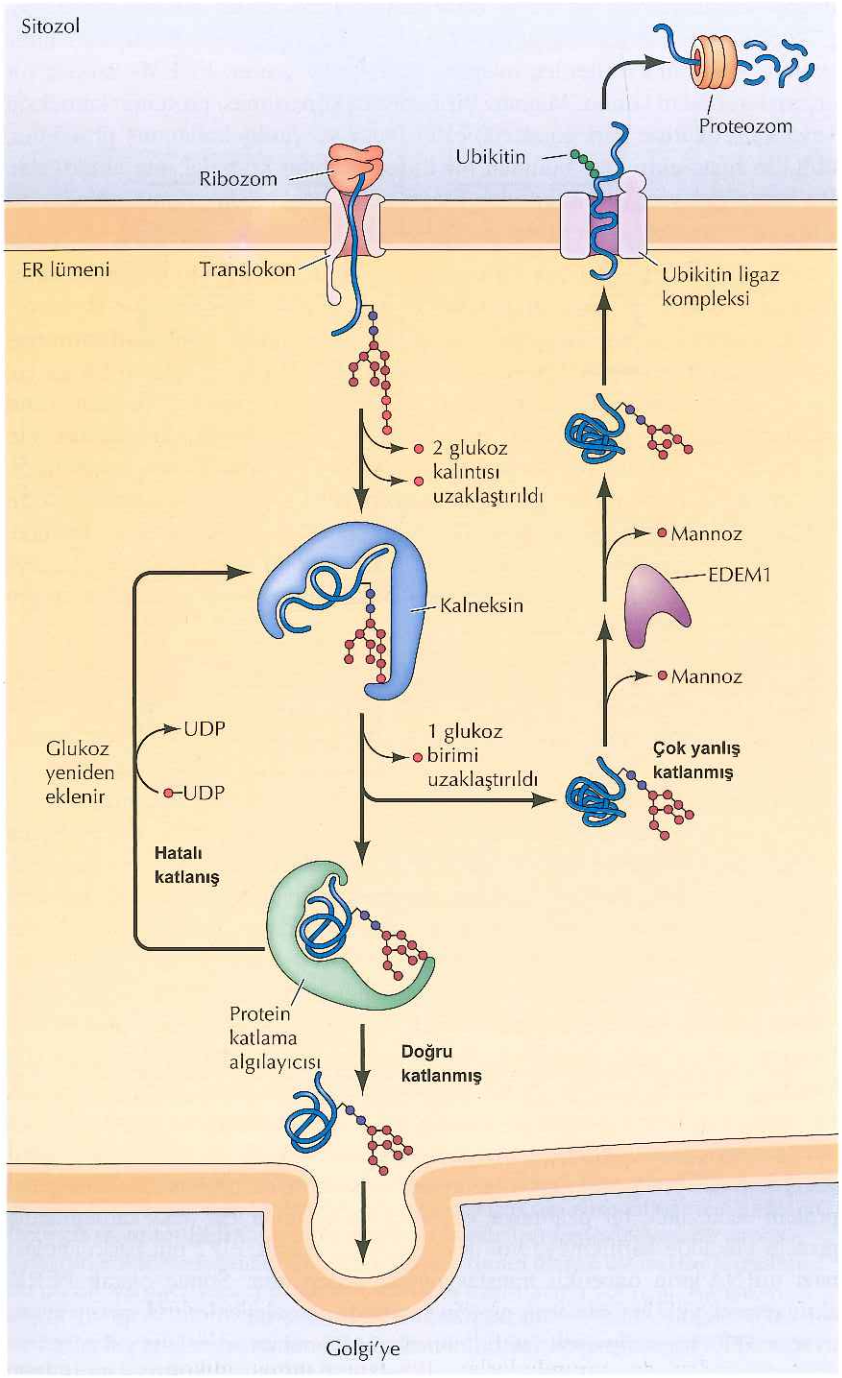
Şekil 11.18 GPI çapalarının eklenmesi Glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapaları iki yağ asidi zinciri, inozitol ve diğer şekerlerden oluşun bir oligosakkarid eklentisi ve etanolaminden oluşmuştur (daha detaylı yapı için bkz. Şekil 9.38). GPI çapaları ER içinde yapılandırıldıktan sonra, membranı kat eden karboksil uçlarından hücre zarına yerleşmiş polipeptidlere eklenirler. Translasyon biter bitmez karboksi uçtaki membranı kat eden bölge uzaklaştırılır ve yeni karboksil uç etanolaminin NH_2 grubuna eklenerek proteinin membrana GPI çapası ile tutunması sağlanır.

ER'de kalite kontrolü

ER içerisinde sentezlenen proteinlerin birçoğu hızla yıkıma uğrar. Bunun başlıca nedeni proteinlerin doğru katlanamamasıdır. ER içerisindeki protein katlanma süreci hem yavaş hem de verimsizdir. Pek çok protein nihai doğru katlanmış formlarına ulaşamazlar. Yanlış katlanmış proteinler önce tanındıkları, sonra ubikitin proteozom sistemince yıkılmak üzere ER'den sitozole aktarıldıkları, **ER-ilişkili yıkım (ER-associated degradation: ERAD)** olarak bilinen bir süreç ile ortadan kaldırılırlar.

ER lümeninde bulunan şaperon ve protein işleme enzimleri protein katlanmasında görev aldıklarından, çoğu kez yanlış katlanmış proteinlerin tanınmasından da sorumludurlar. İyi tanımlanmış glikoprotein katlama

yolaklarından birinde, ER lümeninde yerleşik **kalneksin** ve ER zarında yerleşik **kalretikulin** rol oynar. Hem kalneksin hem kalretikulin, uçtan iki glukoz biriminin ayrılmış olduğu, kısmen işlenmiş oligosakkaridleri tanır (**Şekil 11.19**). Bir peptidil prolil izomeraz ve protein disulfid izomeraz enzimleriyle birlikte kalneksin veya kalretikülin, glikoproteinin doğru üç boyutlu yapısına katlanmasına yardımcı olur (bkz. Şekil 9.28 ve 9.29). Daha

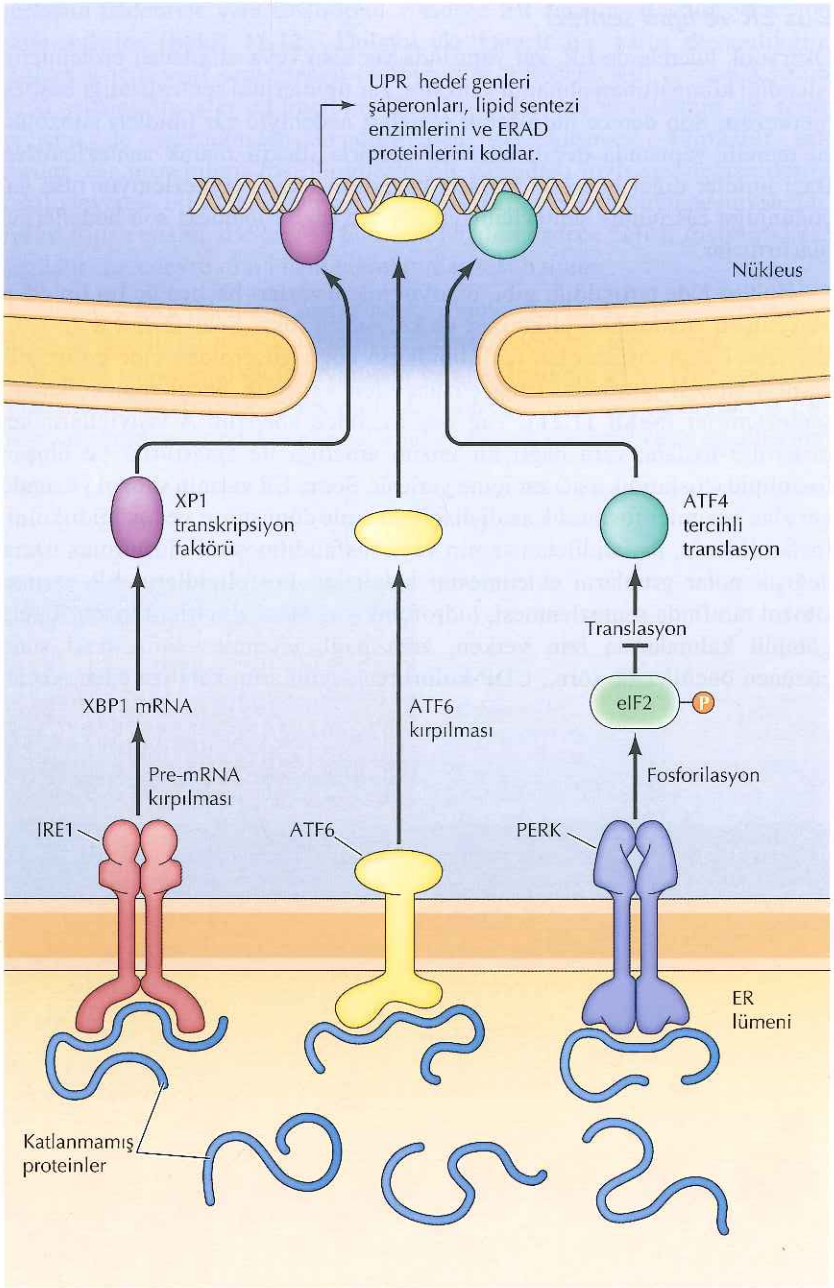


Şekil 11.19 Kalneksin yoluyla glikoprotein katlanması Glikoprotein translokonu terk ederken iki glukoz kalıntısı uzaklaştırılır. Bu kalneksininin bağlanmasını sağlar ve protein katlanmasını destekler. Son glukoz biriminin ayrılması ise proteinin kalneksinle olan ilişkisini sonlandırarak glikoproteinin serbestleşmesini sağlar. Bu aşamadan sonra bir protein-katlama kontrol sistemi, açıkta kalmış hidrofobik bölgelerin olup olmadığını tarar. Eğer yoksa proteinin doğru katlandığı kabul edilir ve transisyonel ER'ye aktarılır. Eğer glikoproteinde yanlış ya da eksik katlanma tespit edilirse, aslında bir glukoziltransferaz enzimi olan katlama-kontrol sensörü, bir glukoz birimini proteine ekleyerek kalneksinin tekrar bağlanmasına ve doğru katlanma için ikinci bir denemeye olanak verir. Eğer açıkta çok fazla hidrofobik bölge varsa ve proteinin düzgün katlanması artık mümkün değilse, protein mannoz birimlerini uzaklaştıran EDEM1 tarafından tanınır. Bu, proteine tekrar kalneksin bağlanmasını önler ve protein ER zarında bulunan bir ubikitin ligaz kompleksi tarafından sitozole aktarılır. Protein bu kompleksin sitozolik yüzünde ubikitinlenir ve proteozomda yıkıma uğrar.

sonra oligosakkaritin ucundaki üçüncü glukoz molekülünün ayrılmasıyla, glikoprotein serbestleşi. Bu glikoproteinin tam ve doğru katlandığını kontrol eden bir protein-katlanma algılayıcısı molekül tarafından tanınmasını sağlar. Eğer doğru katlanma gerçekleşmişse, gliko protein ER'yi terk ederek Golgi'ye doğru yolculuğuna devam eder. Ancak glikoprotein doğru katlanmamışsa, katlanma algılayıcı molekül glukoz birimini oligosakkaride tekrar ekleyerek kalneksin ya da kalretikülinle yeniden etkileşmesine ve doğru katlanma için ikinci denemede bulunmasını sağlar. Tekrarlayan döngülerden sonra halen doğru katlanamayan ve/veya düzeltilemeyecek kadar yanlış katlanmış, glikoproteinler ise yıkım için ERAD yolağına hedeflenirler. Yanlış katlanmış protein, oligosakkaridlerden mannoz birimlerini ayıran, EDEM1 adında bir enzim tarafından tanınır. Mannoz birimlerinin koparılması proteinin kalneksin veya kalretikuline geri gönderilmesini önler ve yanlış katlanmış proteinler, ubikitin ligaz aktivitesi bulunan bir transmembran kompleksine aktarılırlar. Bu kompleks yoluyla ubikitinlendikleri ve proteozomda yıkıma uğradıkları sitozole geri gönderilirler (bkz. Şekil 9.46).

ER'nin protein katlama kapasitesi ile hücrenin fizyolojik ihtiyaçlarını koordine edebilmek için, katlanmamış protein düzeyi sürekli izlenir. Bu süreç, ER içerisinde katlanmamış protein birikimi ile aktive olan **katlanmamış protein yanıtı** (***unfolded protein response:*** **UPR**) olarak bilinen bir sinyal yolağı tarafından düzenlenir (**Şekil 11.20**). Katlanmamış protein yanıt yolağının aktivasyonu, ER'nin genişlemesine, artan ihtiyacı karşılamak için ek şaperon yapımına ve bunlara ek olarak da yeni sentezlenen proteinlerin ER'ye geçiş düzeyinin geçici olarak azaltılmasına yol açar. Bu değişikliklerin ER'deki katlanmamış protein düzeyini normale çekememesi halinde, katlanmamış protein yanıt yolağının aktivasyonu programlanmış hücre ölümünü (bkz. Bölüm 18) tetikler. Böylelikle sentezlenen proteinleri doğru katlayamayan hücreler ortadan kaldırılır.

Memeli hücrelerinde, katlanmamış protein yanıt yolağının uyarılmasından, ER lümenindeki katlanamamış proteinler tarafından aktive edilen, ER zarına yerleşik üç sinyal molekülü ya da stres algılayıcısı (IRE1, ATF6 ve PERK) sorumludur (bkz. Şekil 11.20). IRE1'in (mayadaki tek ER stres algılayıcısı) aktivasyonu, ER membranının sitozolik yüzeyinde XBP1 adlı bir transkripsiyon faktörünü kodlayan mRNA'nın kırpılması ve bunun sonucunda da aktivasyonuna yol açar. Bunu takiben, bir transkripsiyon faktörü olan XBP, aralarında şaperonlar, lipid sentez enzimleri ve ERAD proteinlerinin bulunduğu, katlanmamış protein yanıtında görevli proteinlere ait genlerin ekspresyonunu uyarır. İkinci bir ER stres algılayıcısı olan ATF6'nın kendisi bir transkripsiyon faktörüdür. Normal koşullarda (ER stresinin bulunmadığı koşullarda) ER membranında yoğun yerleşim gösteren bu protein, ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikimi durumunda uyarılarak Golgi aygıtına göç eder. Golgi aygıtında kırpılarak aktifleşen ATF6 sitozolde serbestleşir ve buradan çekirdeğe geçerek katlanmamış protein yanıtında görevli genlerin ekspresyonunu uyarır. Üçüncü stres algılayıcısı olan PERK, translasyon başlatıcı faktörü olan eIF'yi (bkz. Şekil 9.21) fosforilleyerek baskılayan bir protein kinazdır. eIF2'nin baskılanması genel protein sentezinde bir azalmaya ve bunun sonucunda ER'deki katlanmamış protein yükünde hafiflemeye yol açar. Buna ek olarak, eIF2'nin baskılanması bazı mRNA'ların öncelikli translasyonuna neden olur. Sonuç olarak PERK aktivasyonu, yine katlanmamış protein yanıtında görevli genlerin ekspresyonunu uyaran ATF4 transkripsiyon faktörünün ekspresyonunun artmasına yol açar.

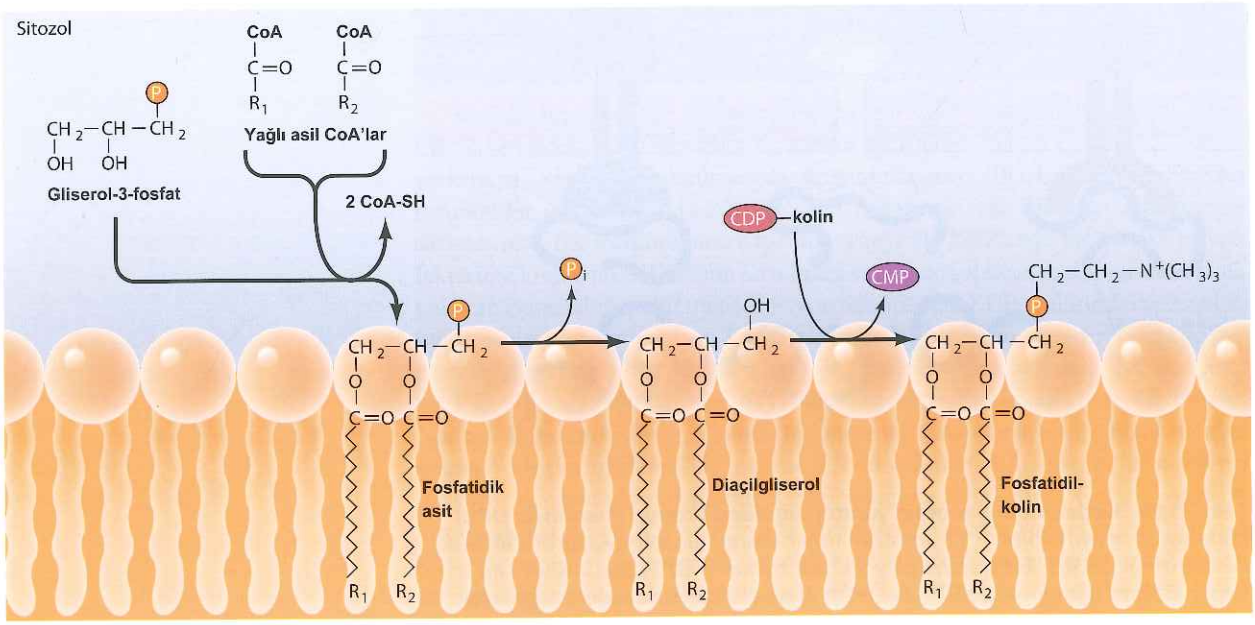


Şekil 11.20 **Katlanmamış protein yanıtı (*Unfolded Protein Response:* UPR)** Katlanmamış proteinler, ER membranında bulunan üç ayrı reseptörü aktive eder. Birincisi, IRE1, bir transkripsiyon faktörünün (XBP1) pre-mRNA'sını kırpar. Bunun sonucunda XBP1 sentezlenir ve sitozolden nükleusa geçerek UPR hedef genlerinin transkripsiyonunu uyarır. İkinci reseptör ATF6, kırpılır ve yine bir transkripsiyon faktörü olan aktif ATF6'nın serbestleşmesi sağlanır. Üçüncü reseptör PERK, eIF2 translasyon faktörünü fosforilleyen bir protein kinazdır. Fosforilasyon sonucu translasyon genel olarak bir miktar baskılanır. Bu da ER'ye giriş yapan protein miktarının azalmasına yol açar. Ayrıca, seçici olarak ATF4 transkripsiyon faktörünün protein sentezi uyarılarak, lipid sentezinde yer alan enzimler, ERAD proteinleri ve şaperonlar gibi UPR hedef genlerinin tarnskripsiyonunu indükler.

Düz ER ve lipid sentezi

Ökaryotik hücrelerde ER, zar yapısında yer alan veya salgılanan proteinlerin işlendiği kompartman olmanın yanı sıra, zar lipidlerinin sentezlendiği başlıca merkezdir. Son derece hidrofobik olmaları nedeniyle zar lipidleri sitozolün su temelli yapısında değil, hücresel zarlarla ilişkili olarak sentezlenirler. Bazı lipidler diğer hücresel zarlarla bağlantılı olarak sentezleniyor olsa da, çoğunluğu ER içinde sentezlenir ve ER'den hücre içindeki son hedeflerine ulaştırılırlar.

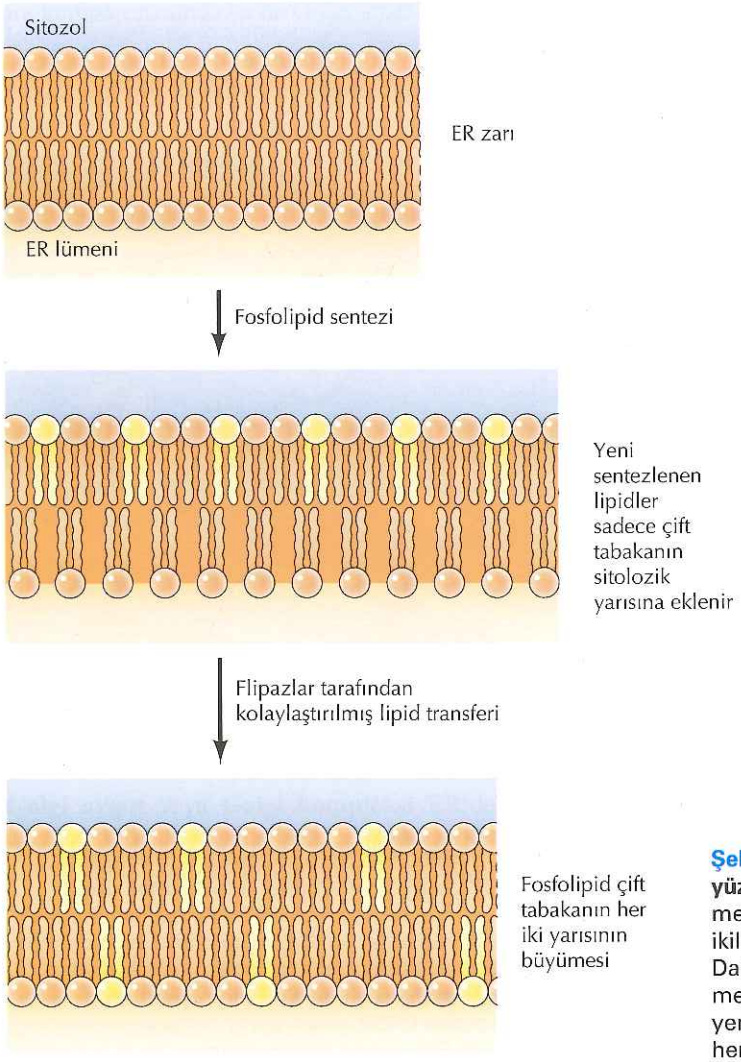
Bölüm 2'de tartışıldığı gibi, ökaryot hücre zarları başlıca üç tip lipidden oluşmuştur: fosfolipid, glikolipid ve kolesterol (bkz. Şekil 2.7, 2.8 ve 2.9). Zar temel yapı taşları olan fosfolipidlerin çoğu gliserolden elde edilir. ER zarının sitozol tarafında, suda çözünebilen sitozolik öncül moleküllerden sentezlenirler (**Şekil 11.21**). Yağ asitleri, önce koenzim A taşıyıcılarından gliserol-3-fosfata, zara bağlı bir enzim aracılığı ile aktarılırlar ve oluşan fosfolipid (fosfatidik asit) zar içine yerleşir. Sonra ER zarının sitozol yüzünde yer alan enzimler fosfatidik asidi diaçilgliserole dönüştürür ve fosfatidilkolin, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin veya fosfatidilinositol oluşturmak üzere değişik polar grupların eklenmesini katalizler. Fosfolipidlerin ER zarının sitozol tarafında sentezlenmesi, hidrofobik yağ asidi zincirlerinin zar içinde gömülü kalmalarına izin verken, zara bağlı enzimler sitozoldeki suda çözünen öncüller ile (örn., CDP-kolin) reaksiyonlarını katalize eder. Ancak



Şekil 11.21 Fosfolipid sentezi Gliserol fosfolipidler, ER membranında sitozolik prekürsörlerden sentezlenirler. Koenzim A (CoA) taşıyıcılarına bağlanmış 2 yağ asidi önce gliserol-3-fosfat ile birleşerek membrana kendiliğinden yerleşen fosfatidik asidi oluşturur. Bu aşamadan sonra bir fosfataz, fosfatidik asidi diaçilgliserole (DAG) dönüştürür. DAG polar fosfokolin baş grubunun eklenmesiyle fosfatidilkoline dönüştürülür.

yerleşim nedeniyle yeni fosfolipidler sadece ER zarının sitozolik yüzeyine eklenebilirler (Şekil 11.22). Dolayısıyla kararlı bir zarın devamlılığını sağlamak için yeni sentezlenen fosfolipidler, ER'deki ikili zar tabakasının öteki yüzüne transfer edilmelidir. Bu olay polar baş gruplarının zar içine geçişini de içerdiğinden kendiliğinden gerçekleşmez. **Flipazlar** adı verilen zar proteinleri, fosfolipidlerin ER zarındaki hızlı yer değişimlerini katalizleyerek, ikili tabakanın her iki yarısının da dengeli büyümesini sağlar. Farklı flipaz enzim aileleri –ki bunların bazıları sadece belirli fosfolipidlere özgüdür- neredeyse tüm hücre membranlarında bulunur.

Gliserol fosfolipidlerin sentezindeki rolüne ek olarak, ER aynı zamanda diğer iki zar lipidi olan kolesterol ve seramid için de temel sentez yeridir. Kolesterol ve seramid Golgi aygıtında ya glikolipidlere ya da sfingomiyeline (gliserolden köken almayan tek zar fosfolipidi) dönüştürülür. Sonuç olarak ER, ökaryot hücre zarlarındaki üç temel lipid grubunun son ürün ya da öncüllerinin



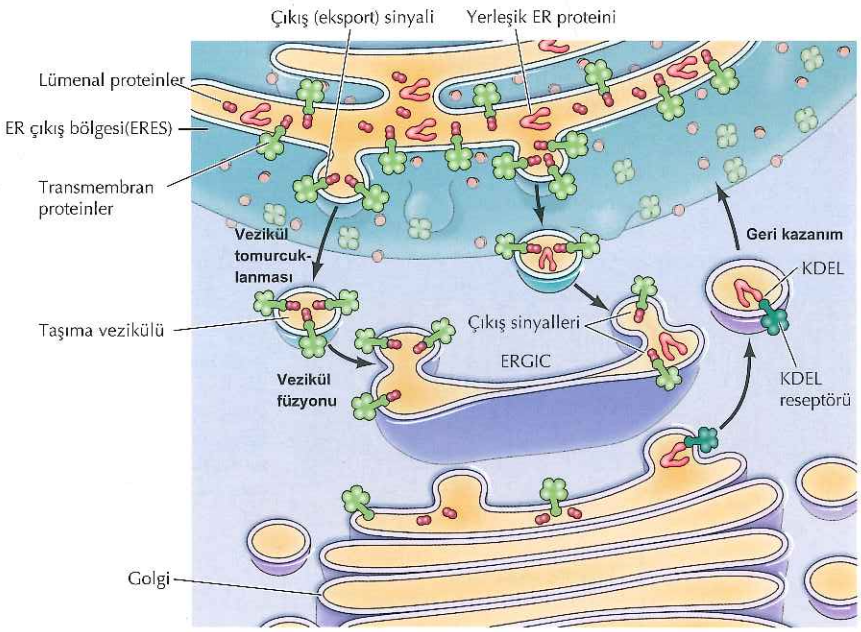
Şekil 11.22 Fosfolipidlerin ER membranının iki yüzü arasındaki yer değişimleri Fosfolipidler ER membranının sitozolik yüzünde sentezlendiğinden, ikili tabakanın sadece sitozolik yüzüne eklenebilirler. Daha sonra fosfolipid flipaz enzimleri sayesinde membranın içinden geçerek karşı tarafa da yerleştirilirler. Bu şekilde fosfofolipid tabakasına ait her iki yarının eşit büyümesi sağlanır.

sentezinden sorumludur.

Düz ER, özellikle lipid metabolizması aktif olan hücrelerde bol miktarda bulunur. Örneğin steroid hormonlar ER'de sentezlenir (kolesterolden). Testis ve yumurtalıktaki steroid sentezleyen hücrelerde, düz ER yüksek miktarlarda bulunur. Buna ek olarak, yağda çözünen çeşitli maddeler, karaciğerdeki enzimler aracılığı ile metabolize olduklarından, karaciğer hücreleri de oldukça fazla miktarda düz ER içermektedir. Bu toksin uzaklaştırıcı enzimler pek çok zararlı ilacı (örn., fenobarbital) suda çözünür hale getirerek, vücuttan idrar ile atılmasını sağlarlar. Sonuçta düz ER, lipidlerin ve yağda çözünen maddelerin metabolizmasında, farklı basamaklarla ilişkilidir.

Protein ve lipidlerin ER'den dışarı çıkışları

Hem proteinler hem de fosfolipidler salgı yolağında, bir zardan tomurcuklanıp diğeriyle kaynaşan taşıyıcı veziküllerle iletilirler. Bu moleküller ER'nin özelleşmiş bir bölgesi olan ER çıkış bölgesinden (*ER exit site:* ERES) tomurcuklanarak çıkış yaparlar (**Şekil 11.23**). Tomurcuklanan bu veziküller, birbirleriyle kaynaşarak ER-Golgi ara kompartmanını (*–ER-Golgi*



Şekil 11.23 ER'den Golgi'ye veziküler taşıma Proteinler ve lipidler ER'den Golgi'ye, ER çıkış bölgelerinden (ERES) tomurcuklanan, sonra ER-Golgi ara kompartmanında (ERGIC) vezikül ve tübülleri oluşturmak üzere kaynaşan ve sonra da Golgi'ye taşınan, taşıma vezikülleri ile taşınır. Golgi'ye hedeflenmiş luminal ER proteinleri veziküller içinde seçici olarak paketlenen transmembran proteinlere bağlanır. ER lümeninde kalacak olan proteinler karboksi uçlarından KDEL "geri dönme" dizisi ile işaretlenmişlerdir. Bu proteinler ER'den Golgi'ye taşınırlarsa ERGIC veya Golgi'de bir reseptör tarafından tanınırlar ve seçici olarak ER'ye geri gönderilirler.

intermediate compartment: ERGIC) oluştururlar ve buradan kargolarını Golgi aygıtına aktarırlar. Burada anlatılan salgı yolağının ardışık basamakları aslen, Golgi'nin farklı kompartmanları arasında ve Golgi'den lizozom veya plazma zarına olan vezikül taşınımı ile ilişkilidir. Çoğu durumda bir organelin iç boşluğunda bulunan proteinler, tomurcuklanan taşıyıcı veziküllerin içine paketlenir ve sonrasında da vezikül kaynaşmasıyla alıcı organelin içerisine bırakılır. Zar protein ve lipidleri de benzer şekilde taşınırlar. Bir zarla çevrili organelden diğerine taşınırken topolojik yönelimlerinin korunması önemlidir. Örneğin ER zarının sitozolik yüzünde yer alan bir protein bölgesi, aynı şekilde Golgi ve plazma zarlarının da sitozolik yüzünde yer alır; öte yandan ER zarının lümen yüzünde yer alan proteinler, Golgi'nin de lümen yüzünde ve plazma zarının dışa bakan yüzünde yerleşir (bkz. Şekil 11.11).

ER'den Golgiye hedeflenen transmembran proteinler ER çıkış bölgelerinde veziküllere paketlenebilmelerini sağlayan çeşitli peptid ve karbohidrat sinyal moleküllerini sergilerler. Benzer şekilde ER'den dışarı aktarılan çoğu luminal protein de seçici bir şekilde paketlenmiş transmembran proteinlere tutunmuş durumdadır (bkz. Şekil 11.23). Bu tutunmuş luminal proteinler ya ER-Golgi ara kompartmanında ya da Golgi aparatında serbestleşir.

ER içindeki işaretsiz proteinler de protein paketlenmesi için özel sinyallere ihtiyaç duymayan temel bir taşıma yolağıyla Golgiye aktarılabilirler. Sonuç olarak sadece salgılanacak proteinler değil, ER'de işlev gören proteinler de (örneğin lümendeki BiP, protein disülfid izomeraz ve yukarıda tartışılan diğer proteinler gibi) taşıma veziküllerine paketlenip Golgi'ye aktarılabilir. Bu tür proteinlerin salgı yolağında ilerlemelerine izin verilirse hücre dışına geçecek ve hücreden kaybedileceklerdir. Bunu önlemek için, yerleşik ER proteinleri ER-Golgi ara kompartmanında tanınırlar ve geri-kazanım yolağıyla ER'ye geri taşınırlar (bkz. Şekil 11.23). Örneğin ER'de işlev gören birçok proteinin karboksil uçlarında, ER'de tutulmalarını ya da ER'ye geri kazanımlarını sağlayan bir Lys-Asp-Glu-Leu (tek harfli koduyla, KDEL) hedef dizisi barındırırlar. Normalde ER'de tutulan bir proteinden (örn., BiP) bu dizi delete edilirse, mutant protein önce Golgi'ye taşınır, sonra da hücreden salgılanır. Buna karşılık normalde salgılanan proteinlere KDEL sekansının eklenmesi, onların hücre dışına salgılanmasına engel olur. Bazı transmembran proteinlerin ER'de tutulması, iki lizin kalıntısı barındıran kısa C-ucu dizileri tarafından belirlenir (KKXX dizileri). KDEL ve KKXX dizilerini barındıran proteinler, ER-Golgi ara kompartman zarlarında yerleşik özel reseptörlere bağlanır ve burada veziküllere paketlenerek ER'ye geri gönderilir.

Golgi Aygıtı

Golgi aygıtı veya **Golgi kompleksi** ER'den gelen proteinlerin daha ileri işlendiği ve endozom, lizozom, plazma zarı ve salgı gibi nihai hedef bölgelerine gitmek üzere sınıflandırıldıkları bir fabrika gibi işlev görür. Buna ek olarak, daha önce de belirtildiği gibi, glikolipidler ve sfingomiyelin Golgi içinde sentezlenir. Bitki hücrelerinde Golgi kompleksi, hücre duvarının kompleks polisakkaridlerinin de sentezlendiği merkez olarak işlev görür. Sonuç olarak Golgi aygıtı, salgı yolağı boyunca hareket eden geniş bir yelpazedeki hücresel ürünlerin işlenmesiyle görevlidir.

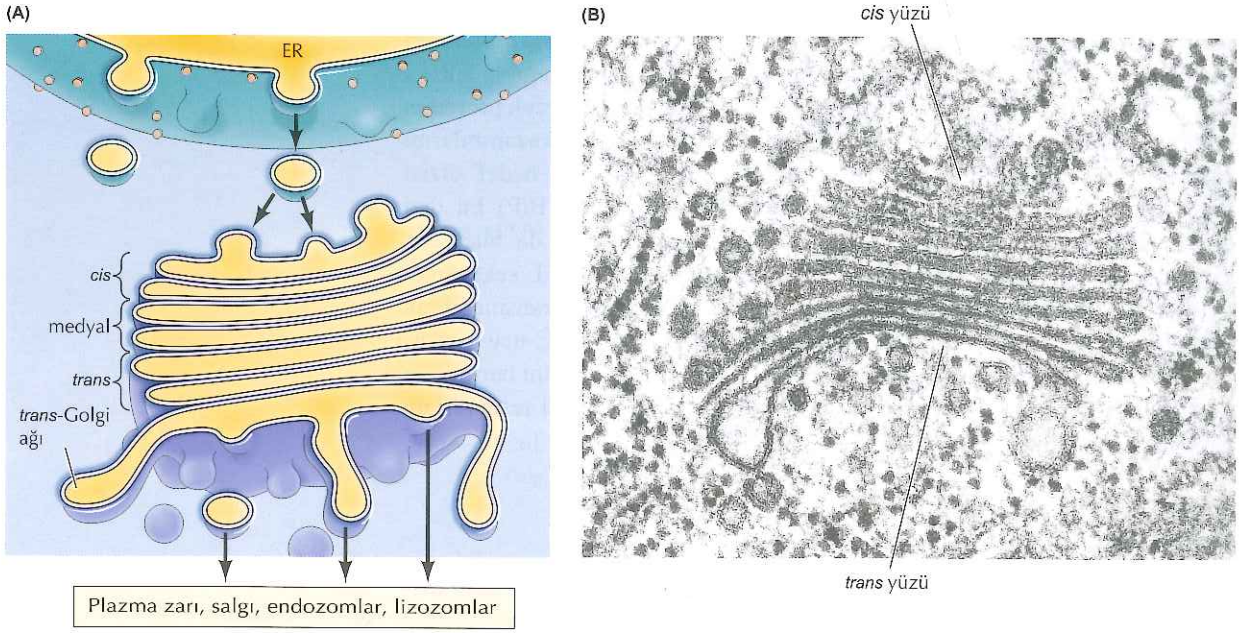
Animasyon 11.2
sites.sinauer.com/cooper7e/a11.2
Golginin Organizasyonu Zarla çevrili yassı keselerden oluşan Golgi aygıtı, proteinleri ER'den alır, onları işler ve son hedeflerine taşınmak üzere sınıflandırır.

Golgi'nin organizasyonu

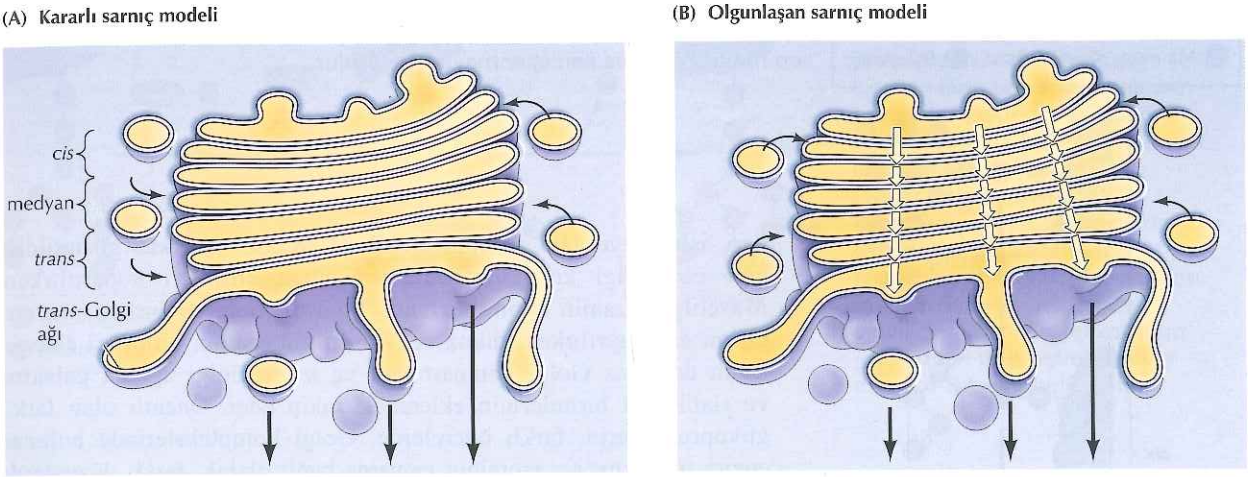
Çoğu hücrede Golgi, zarla çevrili, yassılaşmış keselerden (sarnıçlar - *cisternae*) ve bunlarla ilişkili veziküllerden oluşmuştur (**Şekil 11.24**). Golgi aygıtının dikkat çeken bir özelliği, işlevsel ve yapısal olarak bariz bir polaritesinin bulunmasıdır. ER'den gelen proteinler dışbükey yapıda ve genellikle nükleusa bakan tarafta yerleşik, *cis* yüzünden (giriş yüzü) giriş yaparlar. Sonra Golgi'nin içinden geçerek *trans* yüzünden (çıkış yüzü) çıkarlar. Golgi içinden geçtikleri sırada proteinler, modifiye edilir ve hücre içindeki son hedeflerine taşınmak üzere tasnif edilirler.

Golgi birden fazla farklı bölmeden oluşmuştur. Genel olarak Golgi'nin yapısal ve işlevsel olarak dört bölmeden oluştuğu kabul edilir: ***cis*, medyal ve *trans* alt bölmeler** ve ***trans* Golgi ağı** (bkz. Şekil 11.24). Belirli protein işleme ve sınıflama olaylarının, Golgi kompleksinin farklı bölgelerde sıralı bir işlemler dizisi olarak gerçekleştiği izlenmektedir. ER-Golgi ara kompartmanından gelen proteinler, protein, lipid ve polisakkarid modifikasyonlarının başladığı *cis* Golgi ağına geçerler. Buradan daha ileri modifikasyonların gerçekleştiği Golgi katmanları, medyal ve trans bölmelerinde ilerlerler. Modifiye protein, lipid ve polisakkaridler; endozom, lizozom, plazma zarı ve hücre dışına gidecek şekilde sınıflandırılarak dağıtım merkezi olarak işlev gören *trans* Golgi ağına geçerler.

Proteinlerin hangi mekanizmayla Golgi içinde hareket ettiği hücre biyologları arasında uzun zamandır bir tartışma konusu olmuştur. İki genel



Şekil 11.24 Golgi Aparatı (A) Golgi aparatı, dört bölgeye karşılık gelen bir yassı sarnıç (sisterna) yığınından oluşmuştur: *cis*, medyal ve *trans* kompartmanları ile *trans*-Golgi ağı. ER'den gelen proteinler ve lipidler Golgi aparatının *cis* yüzeyinden giriş yaparlar ve hücre zarına, endozomlara, lizozomlara taşınmak veya salgılanmak üzere ayrıştırıldıkları *trans*-Golgi ağından çıkış yaparlar. (B) Golgi aparatının elekron mikrografı (Dr. Andrew Staehelin'in izni ile Colorado Üniversitesi).



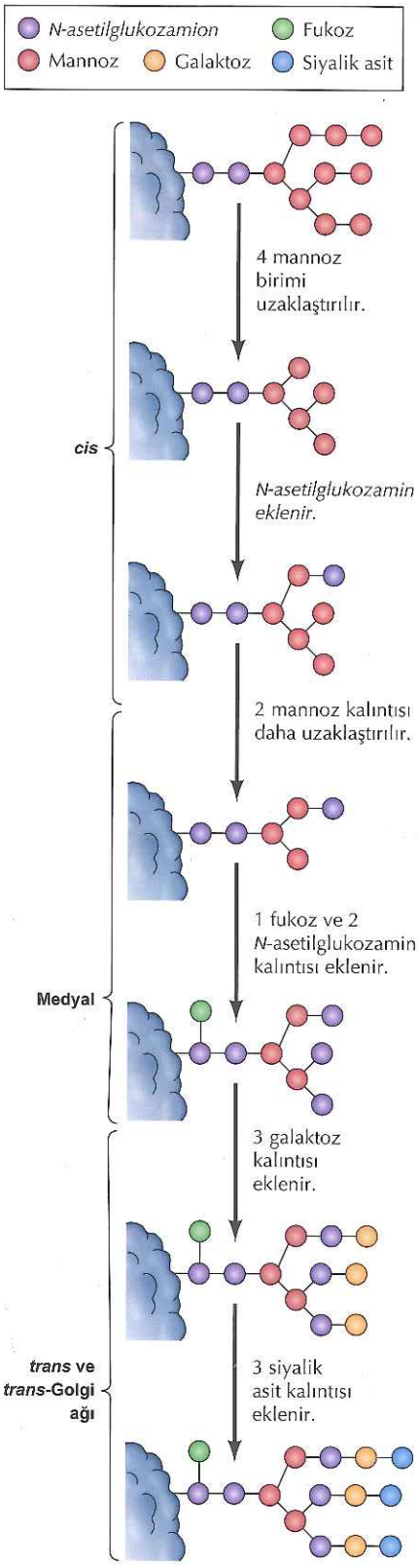
Şekil 11.25 Golgi içi taşıma Kararlı sarnıç modelinde (*stable cisternae model*) (A), proteinler taşıyıcı vezikül içerisinde *cis-trans* yönünden taşınırlar. Olgunlaşan sarnıç modelinde (*cisternal maturation model*) ise (B), proteinler *cis-trans* yönünde ilerledikçe olgunlaşan Golgi sarnıçlarının içerisinde taşınır. Her iki modelde de Golgi'de yerleşik proteinlerin yeniden kullanım için daha erken kompartmanlara geri taşınımı, taşıyıcı veziküller yoluyla olur.

model önerilmektedir, fakat günümüzde mevcut deneysel kanıtları yetersizdir. Kararlı sarnıç *(stabil cisternae)* modelinde (**Şekil 11.25A**) proteinler, Golgi sarnıçları arasında veziküller aracılığı ile taşınmaktadır. Buna göre sarnıçlar kararlı yapılardır ve içlerinde görev yapan aktif enzimler ya burada tutulmakta ya da bir geri dönüşüm döngüsüyle tekrar kullanıma sokulmaktadır. Alternatif model olan olgunlaşan sarnıçlar *(cisternal maturation)* modelindeyse (**Şekil 11.25B**), proteinlerin bulundukları yapı içerisinde Golgi bölmelerinden sırasıyla taşındığı ve her aşamada bu yapının olgunlaşarak Golgi sarnıçları içerisinde, *cis*'den *trans*'a doğru hareket ettiği bir modeli desteklemektedir. Bu alternatif modelde taşıma veziküllerin proteinleri *cis*'den *trans*'a doğru taşımak yerine, Golgi'de işlev gören proteinleri işlev yerlerine geri taşımakla görevli oldukları kabul edilmektedir. Her iki model de Golgi'deki protein trafiğinin bazı yönlerini açıklamakla beraber, tüm özelliklerini açıklayamadığından; bu alanda yapılacak çalışmalara halen ihtiyaç bulunmaktadır.

Proteinlerin Golgi içerisinde glikozillenmesi

Golgi içindeki protein işlenmesi, glikoproteinlerin karbohidrat kısımlarının kapsamlı modifikasyonunu içerir. Memelilerde Golgi aygıtı içerisinde, glikoproteinlere farklı şeker birimlerinin eklenmesini sağlayan 250'den fazla enzim bulunur. Bu enzimler farklı kompartmanlarda yerleşik olduğundan glikoproteinlerde karbohidrat işlenmesi, Golgi kompleksinden taşınırken sıralı bir şekilde gerçekleşir.

İşlenmenin başlıca öğelerinden biri, ER'de proteinlere eklenen *N*-bağlı oligosakkaridlerin modifikasyonudur. Bu bölümde daha önceden tartışıldığı gibi proteinler ER içinde 14 şeker biriminden oluşan bir oligosakkaridin eklenmesiyle modifiye edilirler (bkz. Şekil 11.17). Daha sonra, polipeptidler henüz ER içindeyken üç glukoz birimi uzaklaştırılır. Golgi aygıtına taşınma sonrasında, bu glikoproteinlerin *N*-bağlı oligosakkaridleri daha



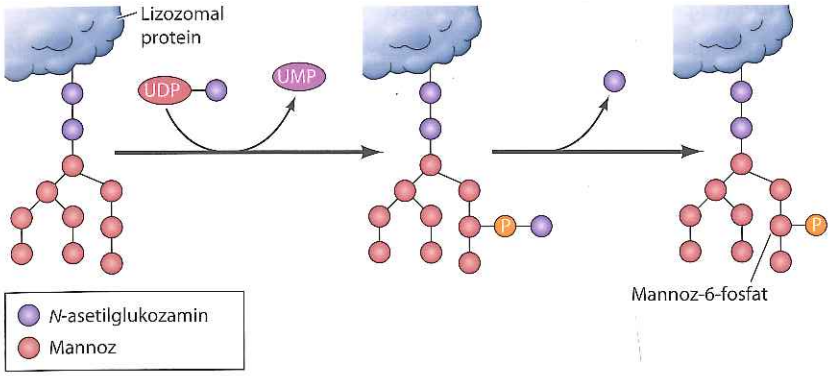
Şekil 11.26 Golgi'de *N*-bağlı oligosakkaridlerin işlenmesi ER'den taşınan *N*-bağlı oligosakakridler, Golgi'de enzimler yoluyla katalizlenen ardışık bir seri modifikasyonla ileri işlenmeye tabi tutulur.

ileri işlenmeye tabi tutulur. Şekil 11.26'daki örnekte gösterildiği gibi *cis* Golgi kompartmanında, mannoz birimleri kopartılırken, *N*-asetilglikozamin birimi eklenir. Medyal Golgide birkaç mannoz birimi daha ayrılırken, fukoz ve *N*-asetilglikozamin birimleri eklenir. Bunu da *trans* Golgi kompartmanı ve *trans* Golgi ağında galaktoz ve sialik asit birimlerinin eklenmesi takip eder. Önemli olan farklı glikoproteinlerin, farklı hücrelerde, Golgi komplekslerinde bulunan enzim miktarına ve proteinin yapısına bağlı olarak, farklı düzeylerde modifiye edilmeleridir. Buna bağlı olarak Golgi aygıtından çok değişik *N*-bağlı oligosakkaridlere sahip proteinler salınır.

Lizozomal proteinlere ait *N*-bağlı oligosakkaridlerin işlenmesi, salgılanan ya da plazma zarına yerleşik proteinlerden farklıdır. Lizozomlara katılacak proteinler başlangıçtaki mannoz birimlerinin uzaklaştırılması yerine, mannoz fosforillenmesi ile değiştirilirler. Bu reaksiyonun ilk aşamasında, *N*-asetilglukozamin fosfatlar, protein hala *cis* Golgi ağında iken, spesifik mannoz birimlerine eklenir (Şekil 11.27). Bunu *N*-asetilglukozamin grubunun uzaklaştırılması ve *N*-bağlı oligosakkaridlerin üzerinde sadece **mannoz-6-fosfat** grubunun bırakılması izler. Bu aşamadan sonra, ileri şüreçlerde mannoz-6-fosfat birimleri uzaklaştırılmaz. Bunun yerine bu birimler, proteinleri lizozoma hedefleyen *trans* Golgi ağında, mannoz-6-fosfat reseptörleri tarafından seçici olarak tanınırlar.

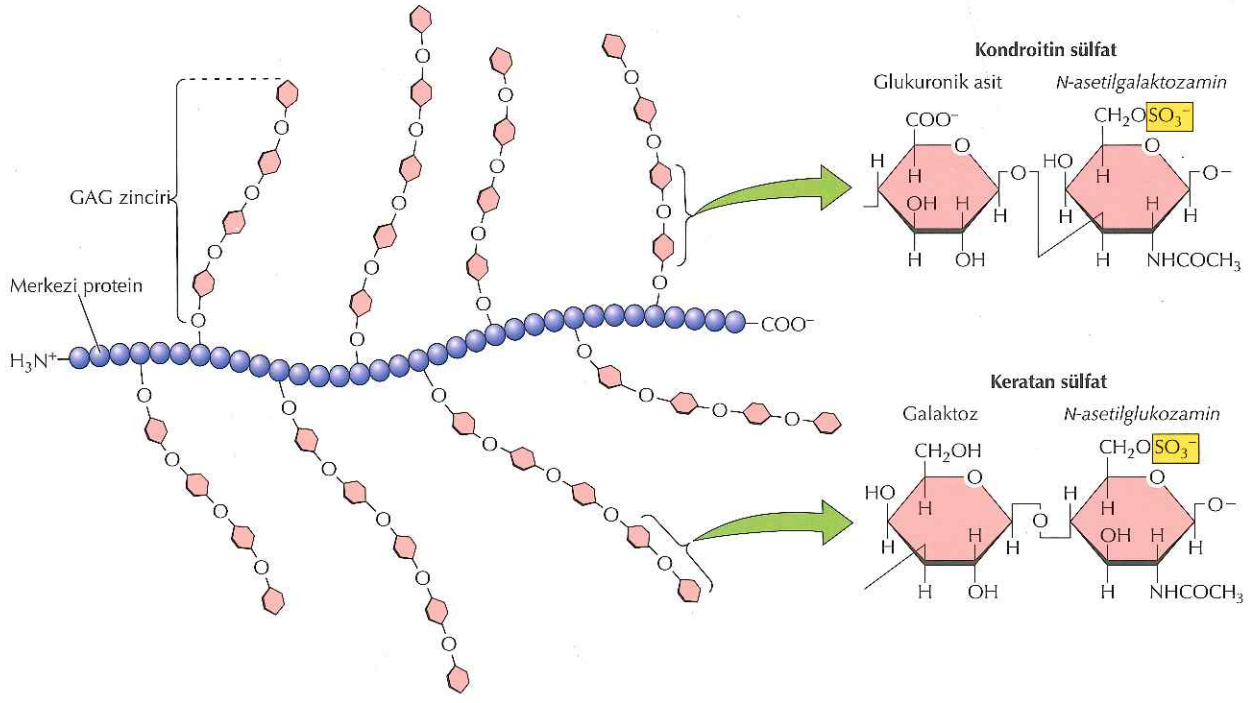
Mannoz birimlerinin fosforillenmesi, lizozomal proteinlerin doğru hücre içi hedeflerine gönderilmek üzere tasnifinde çok önemli bir basamaktır. Sürecin özgüllüğünü, reaksiyonun ilk adımını (*N*-asetilglukozamin fosfatların lizozomal proteinlere seçili olarak eklenmesi) katalizleyen enzim belirler. Bu enzim salgı veya zar proteinlerinde olmayıp, lizozomal proteinlerde bulunan, yapısal bir belirleyiciyi tanır. Tanınmayı sağlayan bu yapısal oluşum, basit bir amino asit dizisi olmayıp, polipeptid zincirinin farklı bölgelerindeki amino asit dizilerinin katlanmış proteinin üç boyutlu yapısında bir araya gelmesiyle oluşur. ER'deki protein translokasyonlarını yönlendiren sinyal dizilerinden farklı olarak, mannoz fosforillenmesine yol açarak proteinleri lizozoma hedefleyen tanınma belirleyicisi, katlanmış proteinin üç boyutlu yapısına bağlıdır. Bu bölümde daha önce tartışılan doğrusal hedef sinyallerinden farklı olarak, bu tür oluşumlara **sinyal yamaları** denir.

Proteinler ayrıca, spesifik amino asit dizileri içerisinde bulunan alıcı serin ve treonin kalıntılarının yan zincirlerine karbohidratların eklenmesiyle de modifiye edilebilir (*O*-bağlı glikozillenme) (bkz. Şekil 9.32). Bu değişimler Golgi aygıtında, tekli şeker kalıntılarının sırayla eklenmesiyle gerçekleşir. Kimi *O*-bağlı oligosakkaridler sadece birkaç şeker kalıntısından, kimisi de uzun şeker zincirlerinden oluşmuştur. Hücre dışı matriksin önemli bir birleşeni olan proteoglikanlar (Bölüm



Şekil 11.27 Mannoz kalıntılarının fosforilasyonu ile lizozomal proteinlerin hedeflenmesi Lizozomların yapısına katılacak proteinler mannoz rezidülerinin 6. pozisyonuna fosfat gruplarının eklenmesiyle seçici olarak tanınır ve modifiye edilir. Reaksiyonun ilk basamağında UDP-*N*-asetilglikozaminden *N*-asetilglikozaminfosfat grupları, mannoz birimlerine transfer edilir. Sonra *N*-asetilglikozamin gruplarının uzaklaştırılmasıyla mannoz-6-fosfat elde edilir.

15'de tartışılmıştır), yoğun *O*-glikozilasyona örnektir. Proteoglikanların Golgide işlenmeleri, her biri 100 şeker biriminden oluşmuş 100 ya da daha fazla karbohidrat zincirinin proteine eklenmesi ve şeker birimlerinin sülfat gruplarının eklenmesi ile ileri modifikasyonlarını kapsar (**Şekil 11.28**).

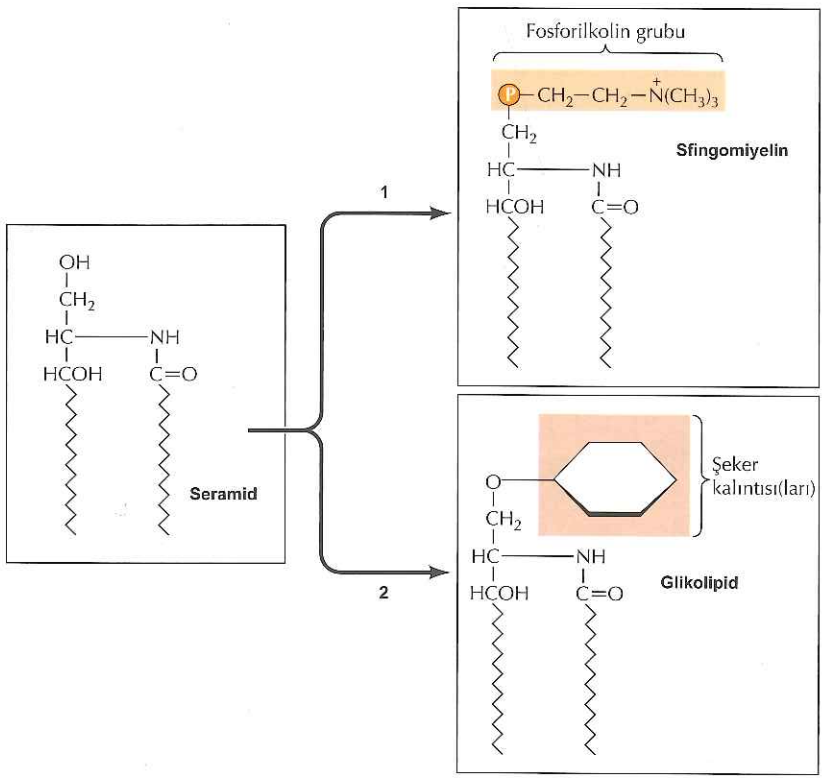


Şekil 11.28 Proteoglikan yapısı Proteoglikanlar, merkezi bir proteine bağlı tekrarlayan disakkaridlerden oluşmuş (örn., kondroitin sulfat ve keratain sülfat) uzun glikozaminoglikan (GAG) zincirleri içerirler. Merkezi proteine 100 kadar GAG zinciri bağlanabileceği gibi; her bir GAG molekülü de 100 kadar şeker kalıntısı içerebilir.

Golgideki lipid ve polisakkarid metabolizması

Glikoproteinlerin işlenmesi ve sınıflanmasının yanı sıra, Golgi aygıtı, lipid metabolizmasında özellikle de glikolipid ve sfingomiyelin sentezinde rol oynar. Önceden tartışıldığı gibi, gliserol fosfolipidler, kolesterol ve seramid ER'de sentezlenir. Daha sonra Golgi aygıtında, seramid kullanılarak, glikolipidler ve sfingomiyelin sentezlenir (**Şekil 11.29**). Sfingomiyelin (hücre zarlarındaki tek gliserolsüz fosfolipid) fosfatidilkolin'den, seramide bir fosforilkolin grubunun aktarımıyla sentezlenir. Buna alternatif olarak, seramide farklı karbohidrat gruplarının eklenmesi geniş çeşitlilikte glikolipidin oluşumunu sağlar.

Sfingomiyelin Golgi'nin lümene bakan yüzünde sentezlenir. Ancak, glukoz seramide sitozole bakan yüzde eklenir. Sonra glukozilseramid lümene bakan yüze aktarılır ve diğer karbohidratlar bu tarafta eklenir. Glikolipidler, bu aşamadan sonra Golgi zarında konum değiştirmezler, bu nedenle sfingomiyelinlerin çoğu Golgi çift tabakasının sadece lümen tarafında bulunurlar. Veziküller taşınma sonrasında, lümen tarafında yerleşimleri gereği, polar baş grupları dışarıya bakacak şekilde plazma zarının dış yüzünde yerleşirler. Bölüm 14'de tartışılacağı gibi glikolipidlerin oligosakkarid kısımları, hücre-



Şekil 11.29 Glikolipid ve sfingomiyelin sentezi ER'de sentezlenen seramid, Golgi'de sfingomiyelin (bir fosfolipid) ve glikolipidlere dönüştürülür. İlk reaksiyonda fosfatidilkolinden bir fosforilkolin grubu seramide aktarılır. Alternatif olarak, bir veya daha fazla şeker grubunun (örn., glikoz) eklenmesiyle çok farklı çeşitlilikte glikolipidin sentezi de mümkündür.

hücre tanımasında önemli yüzey belirteçleri olarak işlev görürler.

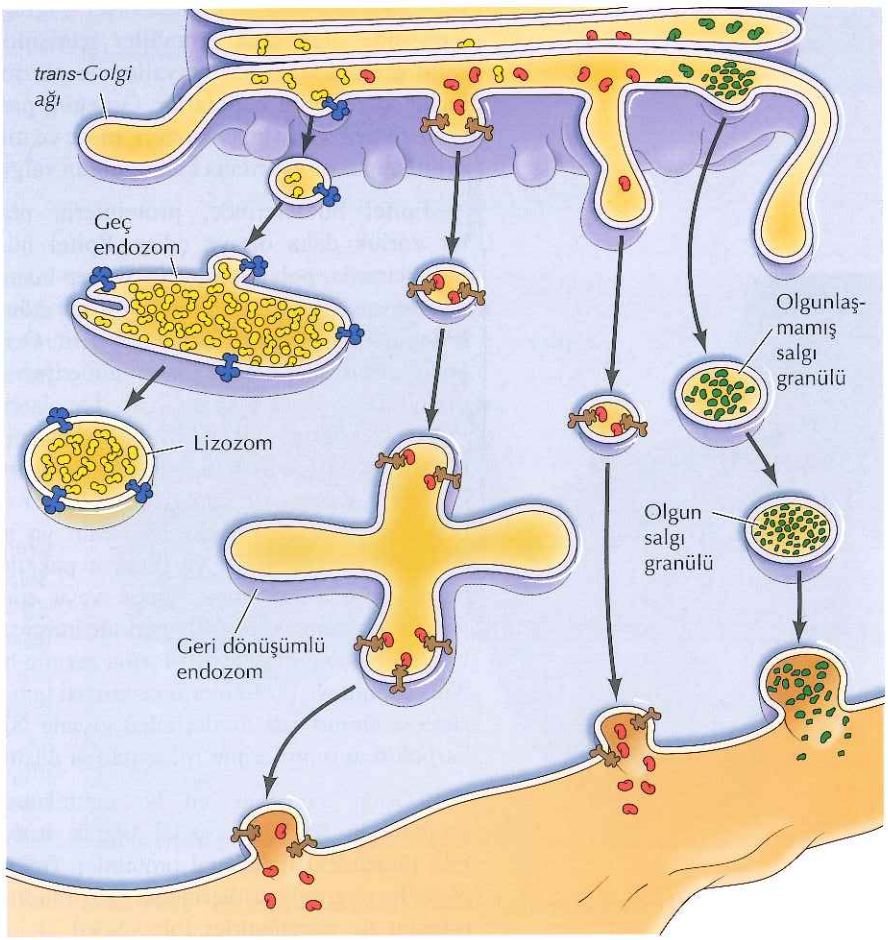
Bitki hücrelerinde Golgi kompleksinin, hücre duvarının kompleks polisakkaridlerinin sentezlenmesi gibi ek bir görevi bulunmaktadır. Bölüm 15'de daha detaylı tartışılacağı gibi, bitki hücre duvarı başlıca üç tip polisakkaridden oluşur. Başlıca birleşeni olan selüloz, glukoz birimlerinin basit doğrusal bir polimeridir. Hücre yüzeyinde, plazma zarındaki enzimler tarafından sentezlenir. Diğer hücre duvarı polisakkaridleri (hemiselülozlar ve pektinler) ise kompleks, dallı zincir moleküller olup, Golgi aygıtında sentezlenir ve sonra veziküller aracılığıyla hücre yüzeyine taşınırlar. Bu hücre duvar polisakkaridlerinin sentezi bitki hücrelerinde önemli bir hücresel işlev olup, Golgi aygıtı metobolik aktivitesinin %80'i polisakkarid sentezine ayrılabilmektedir.

Proteinlerin tasnifi ve Golgi aygıtından dışarı gönderilmesi

Proteinler, lipidler ve polisakkaridler Golgi aygıtından, son yerleşim yerlerine salgı yolağıyla taşınırlar. Bu süreç proteinlerin, *trans*-Golgi ağından tomurcuklanan farklı türlerdeki veziküllere dağıtılmasını ve vezikül içeriğinin, uygun hücresel yerleşim yerine gönderilmesini kapsar (**Şekil 11.30**). Bazı proteinler, doğrudan ya da endozomları bir ara basamak olarak kullanarak Golgi'den plazma zarına taşınırlar. Diğerleri hücreden salgılanır. Diğer bazı proteinler de hayvan hücrelerinde geç lizozom, mayalarda vakuoller gibi başka hücre içi yerleşim yerlerine hedeflenirler.

Video 11.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v11.2
Golgi Aygıtından Tomurcuklanma Taşıma vezikülleri *trans*-Golgi ağından tomurcuklanır ve salgılanacak kargolarını hedeflerine dağıtır.

Golgi aygıtında işlevi olan proteinler, salgı yolağında ilerlemek yerine bu organelin uygun bir bölümünde alıkonulmak zorundadır. Golgi'de tutulan çoğu protein, glikolizasyonda görevli transmembran proteinlerdir ve Golgi'de tutulmalarından



Şekil 11.30 Golgi aparatından sonra taşıma Proteinler *trans*-Golgi ağında tasnif edilerek veziküller içerisinde nihai hedeflerine ulaştırılırlar. Proteinler plazma zarına ya doğrudan ya da geri dönüşümlü endozomlar yoluyla taşınabilirler. Buna ek olarak, düzenlenmiş salgı için proteinler farklı salgı granülleri içinde tasnif edilebilirler. Alternatif bir yol da proteinlerin daha sonra lizozomlara dönüşecek olan geç endozomlara hedeflenmesidir.

sorumlu olan temel sinyal, transmembran ve sitoplazmik bölgelerinde bulunur. Buna ek olarak, ER'de yerleşik proteinler gibi, bazı Golgi proteinlerindeki diziler, proteinlerin salgı yolağındaki ardışık bölmelerden geri dönüşümünü (endozomlardan, *trans*-Golgi ağına geri dönüşüm gibi) sağlar.

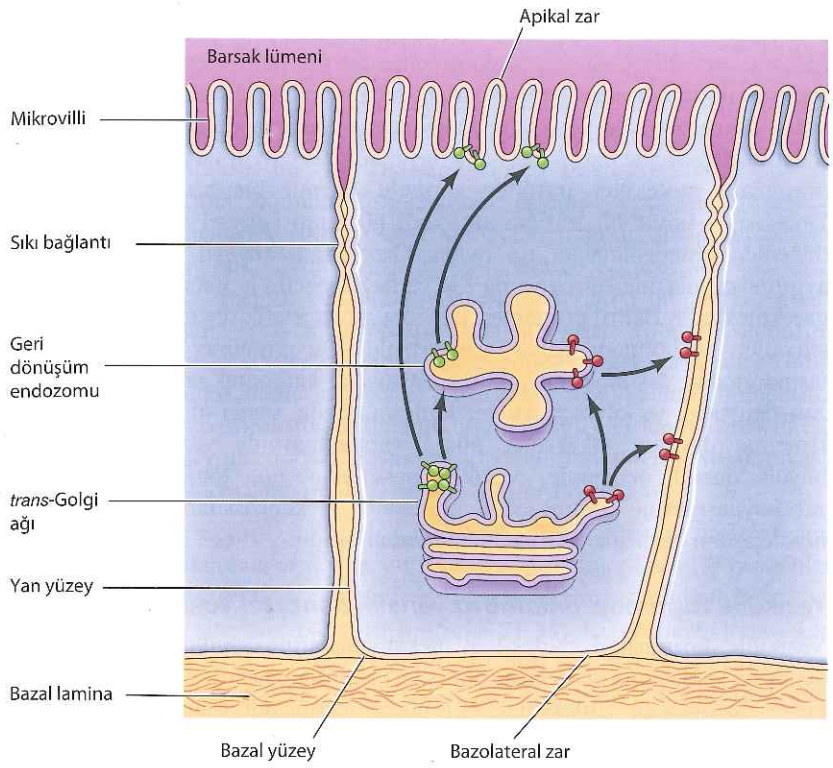
Video 11.3
sites.sinauer.com/cooper7e/v11.3
Post-Golgi Taşıma Golgi aparatında işlendikten sonra, proteinler plazma zarına taşınır.

Golgi aygıtından hücre yüzeyine taşıma en az üç yolla gerçekleşir (bkz. Şekil 11.30). En basit yol, proteinlerin hücreden sürekli salgılanmasına olanak veren; bunun yanı sıra plazma membranına protein ve lipidlerin eklenmesini de sağlayabilen, *trans*-Golgi ağından hücre yüzeyine doğrudan taşımadır. Buna ek olarak proteinler Golgi'den plazma zarına, hayvan hücrelerinde bulunan üç endozom türünden biri olan geri dönüşümlü (*recycling*) endozomların bir ara formuyla da taşınabilirler (bu bölümde ileri de tartışılacaktır).

Ek bir diğer salgı şekli de, bazı hücrelerde bulunan ve çevresel uyarılara yanıt olarak spesifik proteinlerin salgılanmasını sağlayan özel denetimli bir salgı yolağının kullanılmasıdır (bkz. Şekil 11.30). Denetlenebilen salgı yolaklarına örnek olarak: endokrin hücrelerinden hormonların salınması, nöronlardan nörotransmitterlerin salınışı ve bu bölümün başında tartışılan pankreas asiner hücrelerinden sindirim enzimlerinin salınımı verilebilir (bkz. Şekil 11.2). Proteinler, özelleşmiş ancak olgunlaşmamış salgı granüllerine paketlendikleri *trans*-Golgi ağı içerisinde bu denetlenen salgı yolaklarına hedeflenirler. Bu granüllere alınan çoğu protein, *trans*-Golgi ağının göreceli asidik pH (~6.4) ortamında ortaya çıkan yapısal özellikleri nedeniyle bir araya kümelenirler (agrege olurlar). Bu proteinler, süreç içerisinde olgunlaşan granüller içerisinde daha da yoğunlaşırlar. Olgun salgı granülleri, özgül sinyaller ile plazma zarı ile kaynaşmaları uyarılına kadar içeriklerini depolarlar. Örneğin, pankreas asiner hücreleri tarafından sentezlenen sindirim enzimleri, mide ve ince bağırsaktaki besinler tarafından salgılanmaları uyarılana kadar, olgun salgı vezikküllerinde depolanırlar.

Epitel hücrelerinde, proteinlerin plazma membranına taşınmasında bir zorluk daha ortaya çıkar. Epitel hücreleri dokular halinde organize olduklarında, polarize olurlar. Bu tip hücrelerin plazma zarları, kendi özgül işlevlerine göre farklı proteinleri barındıran, **apikal bölge** ve **bazolateral bölge** olarak iki farklı bölgeye ayrılır. Örneğin, bağırsak epitel hücrelerinin apikal plazma zarı bağırsak lümenine bakar ve besinlerin emiliminde görevlidir. Hücrenin kalan kısmı bazolateral zar ile çevrilidir (**Şekil 11.31**). Plazma zarlarına ait farklı bölgeler epitel dışında başka değişik hücre tiplerinde de bulunur. Sonuç olarak, *trans*-Golgi ağından çıkan proteinler bu farklı plazma zarı bölgelerine seçici olarak taşınabilmelidir. Bu sorun, proteinlerin, seçici olarak hücrenin ya apikal ya da bazolateral bölgeye hedefleyen genel salgı vezikülüne paketlenmesiyle çözümlenmektedir. Bu paketlenme *trans*-Golgi ağında veya endozom içerisinde gerçekleşebilir. Proteinler sitoplazmik bölgelerinde bulunan di-lösin (LL) ya da tirozin içeren kısa hidrofobik motiflerle plazma zarının basolateral bölgesine hedeflenirler. Apikal bölgeye proteinlerin taşınması tam olarak anlaşılmamakla beraber bu süreçte amino asit dizilerinden ziyade GPI çapaları (bkz. Şekil 11.18) ve karbohidrat motiflerinin rol oynadığı düşünülmektedir.

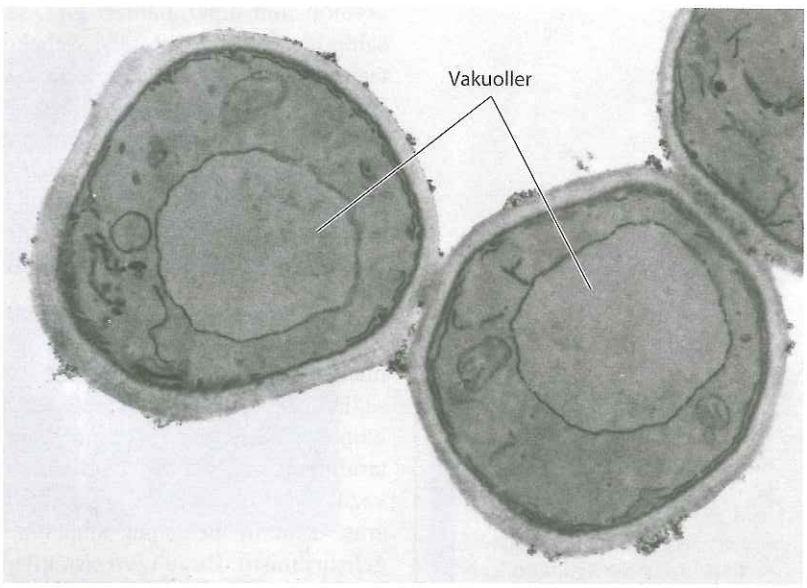
Golgi içerisinde en iyi tanımlanmış protein tasnif ve taşınması, proteinlerin lizozoma seçici olarak hedeflenmesidir. Önceden tartışıldığı gibi lümendeki lizozomal proteinler, Golgi aygıtına girdikten hemen sonra, *N*-bağlı oligosakkaridlerindeki bir modifikasyon sonucu oluşan mannoz-6-fosfat ile işaretlenirler (bkz. Şekil 11.27). *trans*-Golgi ağında mannoz-6-



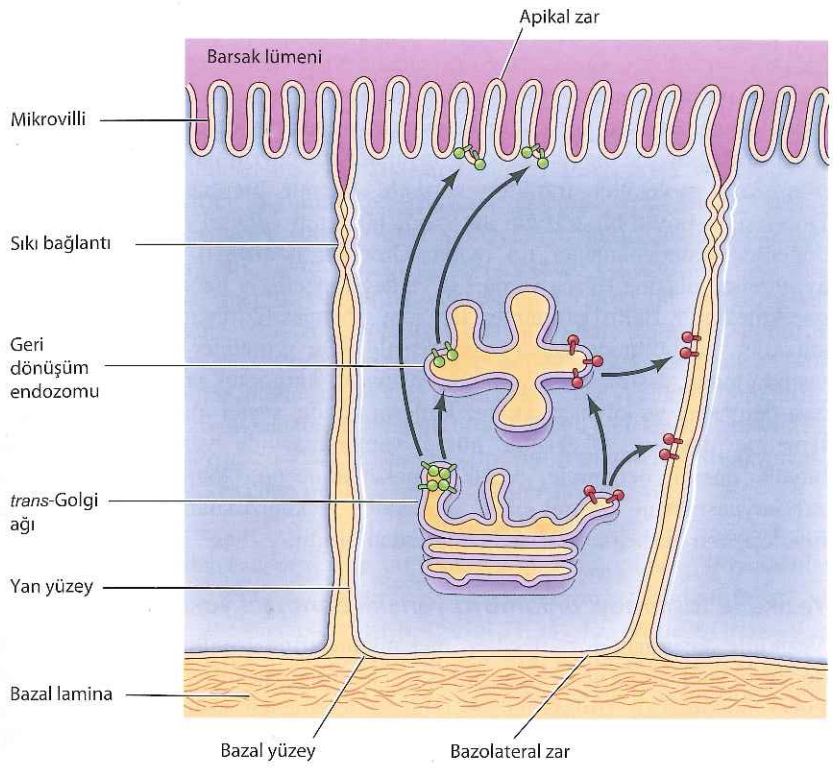
Şekil 11.31 Polarize hücrelerde plazma zarına taşıma Polarize olmuş epitel hücrelerinin plazma zarı apikal ve bazolateral bölgelere ayrılmıştır. Bu örnekte (bağırsak epiteli) hücrenin apikal yüzeyi bağırsak boşluğuna bakarken, yan yüzeyler komşu hücreler ile ilişkide ve alt (bazal) yüzey de ekstrasellüler matrikse yaslanmaktadır (bazal lamina). Apikal zar, emilimin gerçekleşeceği yüzey alanını arttıran mikrovillilerin varlığı ile karakterizedir. Proteinler apikal veya bazolateral zarlara gitmek üzere, *trans*-Golgi ağında ya da geri dönüşümlü endozomlarda hedeflenirler. Komşu hücreler arasındaki sıkı bağlantılar, bu iki bölge arasındaki protein difüzyonunu önleyerek, apikal ve bazolateral zar özelliklerinin korunmasını sağlarlar.

fosfata özgül bir reseptör bu mannoz-6-fosfat birimlerini tanır. Sitozolik bölgelerinde reseptör-lizozomal enzim kompleksi, yönlendirme dizilerini içeren reseptörler, taşıyıcı veziküllere paketlenerek daha sonra lizozomlara olgunlaşacak olan geç endozomlara hedeflenir.

Lizozomları bulunmayan maya ve bitki hücrelerinde proteinler, Golgi aygıtından sonra farklı bir hedefe, **vakuole** hedeflenirler (**Şekil 11.32**). Bu hücrelerde vakuol lizozom işlevlerinin yanı sıra, besinlerin depolanması, ozmotik dengenin ve turgor basınçlarının düzenlenmesi gibi ek görevleri de üstlenir. Lizozomal hedeflenmenin aksine, proteinler vakuole yönlendirilirken karbohidrat işaretler yerine kısa peptid dizileri kullanılır.



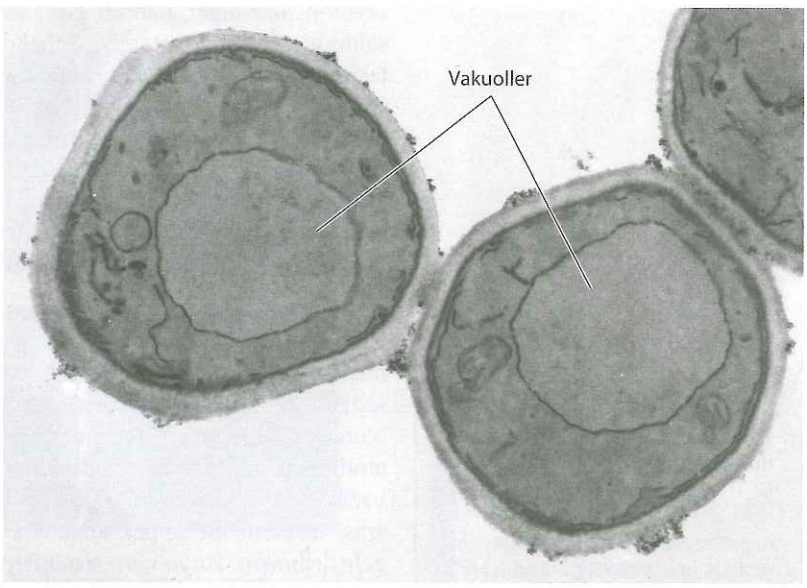
Şekil 11.32 Bir maya vakuolü Vakuol, mayalarda bir lizozom gibi işlev görür.



Şekil 11.31 Polarize hücrelerde plazma zarına taşıma Polarize olmuş epitel hücrelerinin plazma zarı apikal ve bazolateral bölgelere ayrılmıştır. Bu örnekte (bağırsak epiteli) hücrenin apikal yüzeyi bağırsak boşluğuna bakarken, yan yüzeyler komşu hücreler ile ilişkide ve alt (bazal) yüzey de ekstrasellüler matrikse yaslanmaktadır (bazal lamina). Apikal zar, emilimin gerçekleşeceği yüzey alanını arttıran mikrovillilerin varlığı ile karakterizedir. Proteinler apikal veya bazolateral zarlara gitmek üzere, *trans*-Golgi ağında ya da geri dönüşümlü endozomlarda hedeflenirler. Komşu hücreler arasındaki sıkı bağlantılar, bu iki bölge arasındaki protein difüzyonunu önleyerek, apikal ve bazolateral zar özelliklerinin korunmasını sağlarlar.

fosfata özgül bir reseptör bu mannoz-6-fosfat birimlerini tanır. Sitozolik bölgelerinde reseptör-lizozomal enzim kompleksi, yönlendirme dizilerini içeren reseptörler, taşıyıcı veziküllere paketlenerek daha sonra lizozomlara olgunlaşacak olan geç endozomlara hedeflenir.

Lizozomları bulunmayan maya ve bitki hücrelerinde proteinler, Golgi aygıtından sonra farklı bir hedefe, **vakuole** hedeflenirler (**Şekil 11.32**). Bu hücrelerde vakuol lizozom işlevlerinin yanı sıra, besinlerin depolanması, ozmotik dengenin ve turgor basınçlarının düzenlenmesi gibi ek görevleri de üstlenir. Lizozomal hedeflenmenin aksine, proteinler vakuole yönlendirilirken karbohidrat işaretler yerine kısa peptid dizileri kullanılır.



Şekil 11.32 Bir maya vakuolü Vakuol, mayalarda bir lizozom gibi işlev görür.

Veziküller Taşınma Mekanizması

Taşıma vezikülleri, salgı yolağının zarla çevrili farklı bölmeleri arasındaki molekül trafiğinde önemli rol oynarlar. Daha sonra bu bölümde ve Bölüm 14'de tartışıldığı gibi veziküller, hücre yüzeyinden alınan maddelerin taşınması ile de ilişkilidirler. Sonuç olarak vezikülle taşıma, zarla çevrili farklı kompartmanlar arasındaki moleküler trafikten sorumlu önemli bir hücresel aktivitedir. Dolayısıyla böyle bir trafiğin seçiciliği hücrenin işlevsel organizasyonunun düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Örneğin, lizozomal enzimlerin Golgi aygıtından, plazma zarına ya da ER'ye değil, özellikle lizozomlara taşınması gerekmektedir. Belirli proteinleri lizozom gibi spesifik organellere hedefleyen sinyaller, bu bölümde daha önce tartışıldı. Bu proteinler veziküller içinde taşındığından, taşımanın özgüllüğü, taşınacak kargonun sadece doğru hedef zarı tanıyacak ve kaynaşacak veziküllerin içinde, seçici olarak paketlenmesi temeline dayanır. Ökaryotik hücre yapılanmasında vezikülle taşımanın büyük önemi nedeniyle, vezikül paketlenmesini, tomurcuklanmayı ve zar kaynaşmasını kontrol eden moleküler mekanizmaları anlamak, hücre biyolojisinin başlıca araştırma alanlarından biridir.

Vezikülle taşınmayı anlamaya yönelik deneysel yaklaşımlar

Vezikülle taşınmanın moleküler mekanizmalarının aydınlatılması üç ana deneysel yaklaşımla gerçekleştirilmiştir: (1) protein tasnifi ve taşınması bozuk maya mutantların izolasyonu; (2) hücre içermeyen sistemlerde vezikülle taşınmanın yapılandırılması (3) nöronlardan, nörotransmiterlerin kontrollü salınımından sorumlu sinaptik veziküllerin biyokimyasal analizi. Taşıma sisteminin farklı yönlerinin anlaşılmasında her bir deneysel yaklaşımın birbirinden farklı avantajları bulunmakta ve birlikte kullanımlarıyla maya ile memeli nöronu gibi birbirinden oldukça farklı hücrelerde bile benzer moleküler mekanizmaların salgı yolağını düzenlediği gösterilebilmektedir.

Genetik analiz kolaylıkla yapılabildiğinden maya hücresi kullanımı, hücre biyolojisinin diğer alanları gibi, salgı yolağı araştırmalarında da avantajlara sahiptir. Özellikle Randy Schekman ve arkadaşları 1980'de, veziküller taşımanın hatalı olduğu maya mutantlarının izolasyonuna öncülük etmişlerdir. Bu mutantlar arasında: protein salgılamasının değişik basamakları hatalı olan mutantlar (*sec* mutantları), proteinleri vakuollere taşıyamayan mutantlar ve ER'de yerleşik proteinleri yerinde tutamayan mutantlar bulunmaktadır. Maya mutantlarının izolasyonu, doğrudan moleküler klonlamaya ve ilgili genin analizine yol açmış ve sonuç olarak, salgı yolağının farklı basamaklarında görevli proteinler tanımlanabilmiştir.

Vezikülle taşıma alanında yeni yapılandırılmış sistemler kullanılarak yapılan biyokimyasal çalışmalar, genetik çalışmaları desteklemiş ve memeli hücrelerinden taşıma proteinlerinin doğrudan izolasyonuna olanak sağlamıştır. İlk hücre içermeyen taşıma sistemi 1980'de, Golgi aygıtında bölmeler arası protein taşınmasını inceleyen James Rothman ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bunu takiben ER'den Golgi'ye, Golgi'den salgı veziküllerine, vakuollere ve plazma zarına taşınma gibi, farklı bölmeler arası taşınımı incelemek amacıyla benzer yeniden yapılandırılmış sistemler geliştirilmiştir. Bu *in vitro* sistemlerin geliştirilmesi, vezikül tomurcuklanması ve kaynaşmasında rol oynayan bazı proteinlerin doğrudan izolasyonunun yanı sıra, taşıma sürecinin biyokimyasının çalışılmasına ve maya mutantlarında tanımlanan proteinlerin işlevsel analizine olanak sağlamıştır.

Bilgi İçin

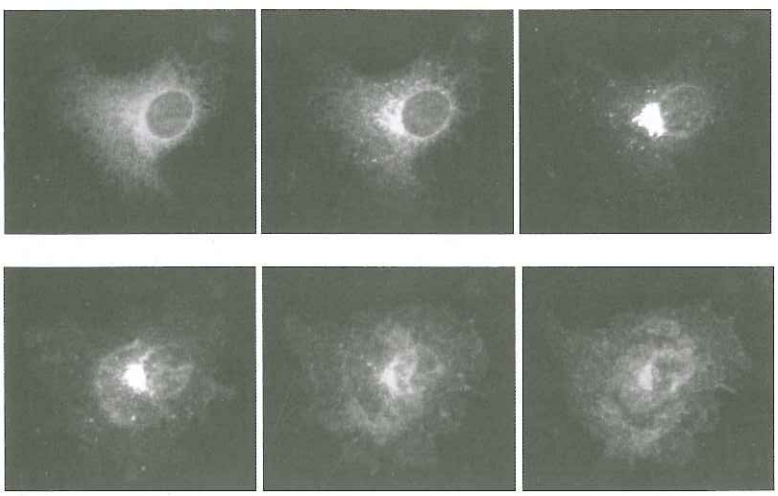
Randy Schekman, James Rothman ve Thomas Südhof, "Hücrelerimizdeki ana taşıma sistemlerinden olan vezikülle trafiği düzenleyen mekanizmalar ile ilgili keşifleri" nedeniyle 2013 Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir.

Veziküle taşınmanın moleküler mekanizmaları ile ilgili önemli edinimler, kontrollü salgılamanın yüksek oranda özgülleşmiş bir biçimini temsil eden nöronlardaki sinaptik ileti çalışmalarından sağlanmıştır. Sinaps, bir nöron ile başka bir hücrenin; bir diğer nöron veya kas hücresi gibi bir efektör olabilir, bir araya geldiği kavşak noktasıdır. Sinapsta, **sinaptik veziküllerde** depolanan asetilkolin gibi sinirsel ileticiler (nörotransmiter) aracılığıyla bilgi aktarımı gerçekleşir. Aktarıcı nöronun tetiklenmesi, sinaptik veziküllerin plazma zarıyla kaynaşmasına ve sonuç olarak sinirsel ileticilerin sinaps boşluğuna salınarak post-sinaptik nöronu veya efektör hücreyi etkilemesine yol açar. Beyin dokusunda sinaptik veziküller yüksek miktarlarda bulunurlar, bu da biyokimyasal analiz için izolasyonlarını olanaklı kılar. Thomas Sudhof'un laboratuarında sinaptik veziküllerden izole edilen proteinlerin araştırıldığı çalışmalar sonucunda, bunların çoğunun maya genetiği ve yeniden yapılandırma çalışmalarıyla veziküle taşımada önemli rolleri olduğu belirlenmiş proteinlerle büyük benzerlikler taşıdıkları gösterilmiştir. Bu proteinlerin biyokimyasal analizi veziküle kaynaşma ile ilgili önemli veriler sağlamıştır.

Veziküler transportu ile ilgili bilgilerimiz GFP füzyon proteinlerinin kullanılması ile daha da artmıştır. GFP füzyon proteinler spesifik proteinleri taşıyan veziküllerin salgı yolağındaki hareketlerinin immünfloresan ile görüntülenebilmesine olanak vermiştir (**Şekil 11.33**). Bu tür deneylerde, yeşil floresan proteinle (GFP) işaretli salgı proteinlerini kodlayan cDNA vektörleri hücrelere transfekte edilirler (bkz. Şekil 1.28). Bu teknikle canlı hücrelerde, GFP işaretli proteinlerin salgı yolağında ilerlemesi izlenebilmekte; veziküler taşımanın dinamiğiyle ve katıldığı moleküler etkileşimler ile ilgili pek çok bilgi elde edilmektedir.

Kargo seçimi, kaplayıcı proteinler ve vezikül tomurcuklanması

ER'den ileri kompartmanlara salgı proteinlerini taşıyan veziküller, sitozolik manto proteinleri ile kaplı olduklarından, mantolu veziküller olarak

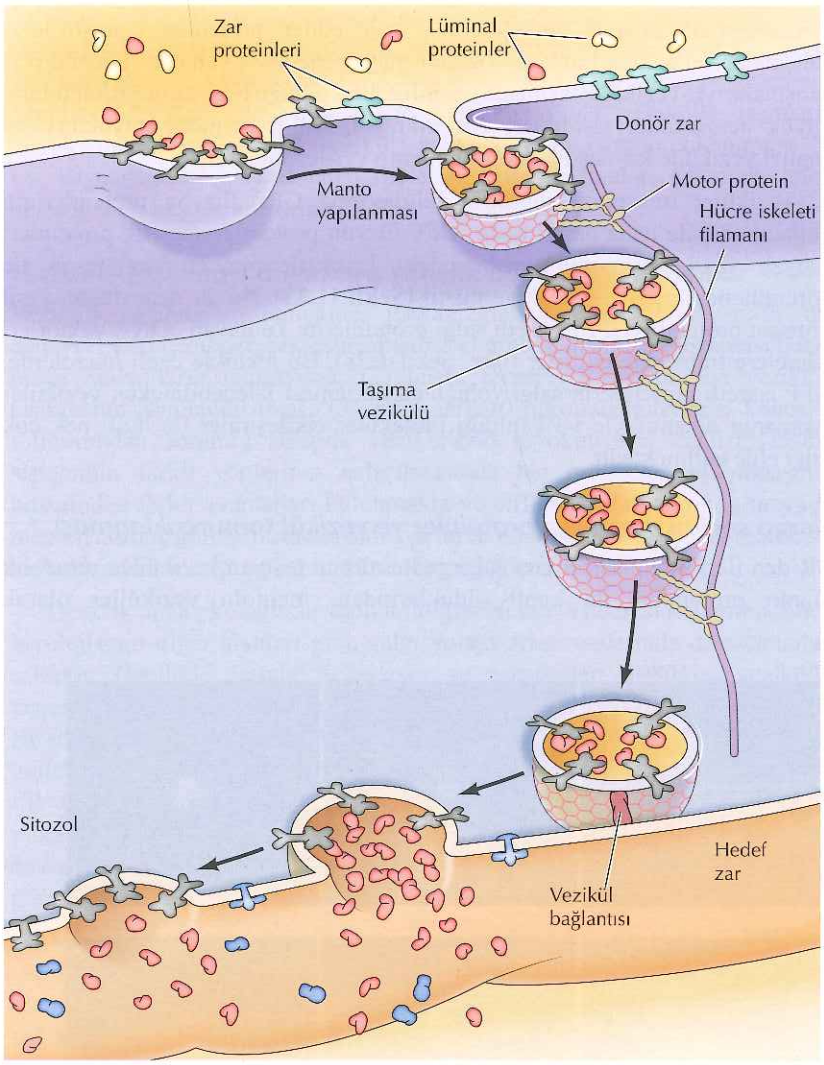


Şekil 11.33 Canlı bir hücrede taşıyıcı veziküllerin görüntülenmesi GFP işaretli veziküllerin ER'den Golgi'ye ve Golgi'den hücre zarına hareketini görebilmemizi sağlayan, belirli zaman aralıklarında çekilmiş bir seri görüntü (Jennifer Lippincott-Schwartz'ın izniyle).

Video 11.4
sites.sinauer.com/cooper7e/v11.4
Vezikül Trafiği Taşıma veziküller, hücre iskeletini oluşturan filamanlar boyunca ER, Golgi ve hücre zarı arasında hareket eder.

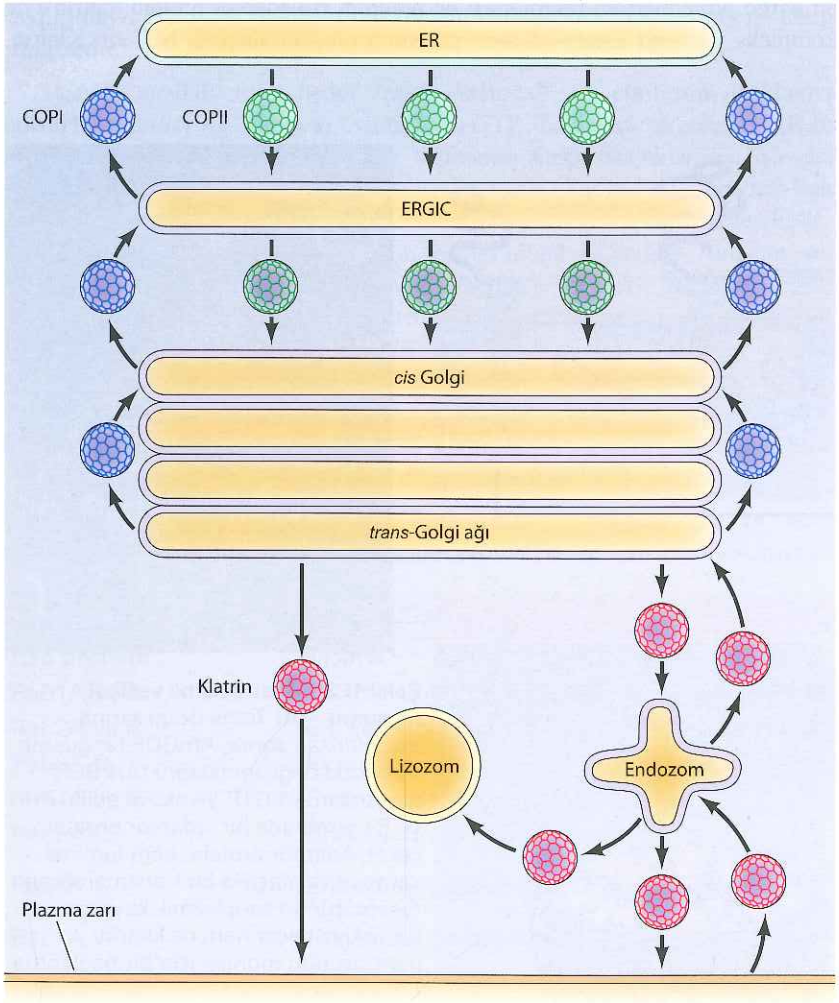
adlandırılar. Spesifik kargo proteinlerini barındıran vezikülün etrafında manto proteinlerinin bir araya gelmesi, verici membrandan tomurcuklanma sürecinin yürütülmesinde önemli rol oynar (**Şekil 11.34**). Daha sonra veziküller Bölüm 13'de anlatıldığı gibi hücre iskelet filamanları üzerinde ilerleyerek hedeflerine ulaşır. Hedef membranda manto proteinleri vezikülden ayrılarak veziküllerin zarla kaynaşmasına, lüminal kargolarını boşaltmalarına ve membran proteinlerinin hedef membranda yerleşimine izin verir.

Üç vezikül manto protein ailesi tanımlanmıştır: **klatrin**, **COPI** ve **COPII** (COP, manto proteinini gösterir). Bu farklı proteinler ile kaplanmış veziküller,



Şekil 11.34 Bir taşıyıcı vezikülün oluşumu ve kaynaşması Salgılanacak lüminal proteinler ve membran proteinleri, reseptörleriyle beraber verici (donör) membranın seçilmiş bölgelerinde toparlanırlar. Bu bölgelerdeki sitozolik manto oluşumu, taşıyıcı veziküllerin tomurcuklanmasına yol açar. Vezikül, hücre iskeleti filamanları üzerinden motor proteinler tarafından hedefine taşınır. Taşıyıcı vezikülün hedef membrana yanaşmasıyla manto ayrılır ve vezikül hedef membranla kaynaşır.

salgı yolağının farklı kompartmanları arasında taşımacılık yapar (Şekil 11.35). **COPII-kaplı veziküller** transisyonel ER'den tomurcuklanarak kargolarını, ER'den ER-Golgi ara kompartmanına (ERGIC), oradan da, Golgi aygıtına ve salgı yolağında ileriye doğru taşıyarak götürür. Buna karşılık, **COPI-kaplı veziküller**, ER- Golgi ara bölmelerinden veya Golgi aygıtından tomurcuklanır ve kargolarını yolakta geriye doğru taşıyarak daha önceki kompartmanlara geri götürür. Diğer bir ifadeyle ER proteinlerini, Golgi ağı veya ER-Golgi ara bölmesinden ER'ye geri taşıyan ve Golgideki enzimleri daha ileri golgi kompartmanlarından geriye taşıyan COPI kaplı vezikülllerdir. Son olarak **klatrin kaplı veziküller** kargoların *trans* Golgi ağından endozom, lizozom ve hücre zarına doğru taşınmasından sorumludur.

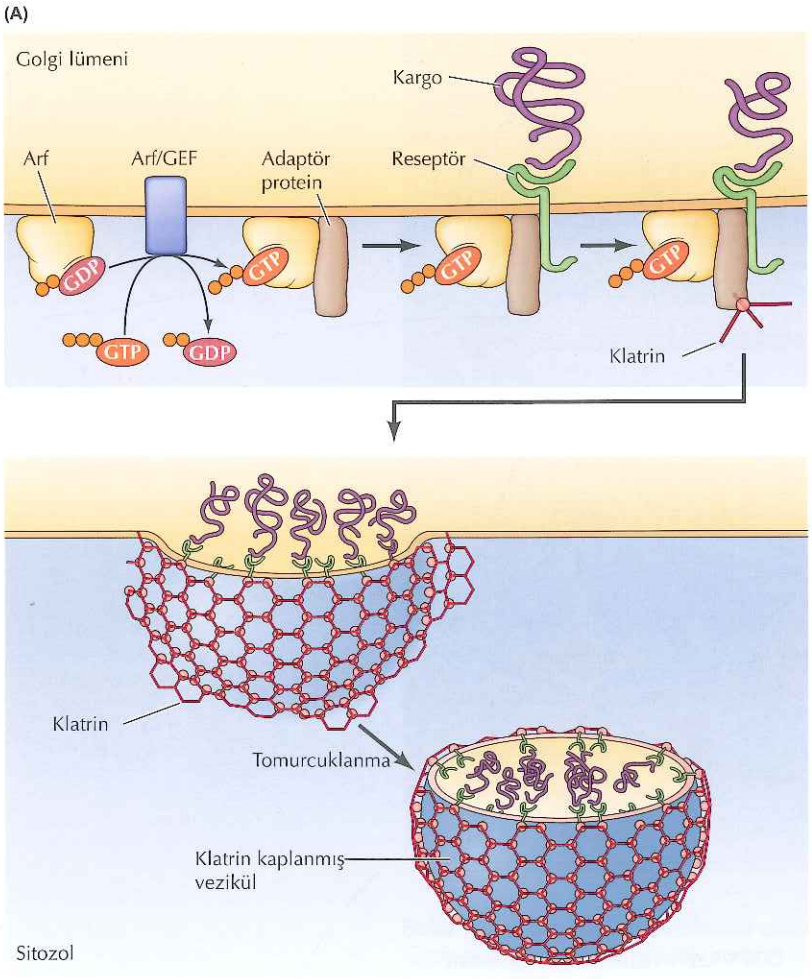


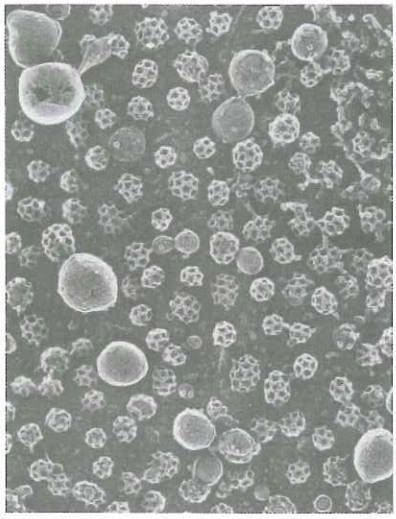
Şekil 11.35 Mantolu vezikküllerle taşıma COPII kaplı veziküller kargolarını ER'den Golgi'ye, klatrin kaplı veziküller ise kargolarını *trans*-Golgi ağından ileriye taşır. Buna ek olarak, klatrin kaplı veziküller plazma zarından geriye, endozom ve *trans*-Golgi ağı ile lizozomlar gibi organellere de kargo taşır. COPI kaplı veziküller ise ER'de yerleşik proteinleri ERGIC'den, *cis*-Golgi'de yerleşik olan proteinleri *trans*-Golgi'den, erken Golgi sisternalarına geri taşır.

Bilgi İçin

Griscelli sendromu Rab27a genindeki mutasyonlar sonucu gelişen, nadir bir hastalıktır. Rab27a, pigment içeren veziküllerin (melanozomların) deri ve saça taşınmasında ve T lenfositlerdeki veziküllerin ekzositozunda anahtar rol oynamaktadır. Griscelli sendromu hastalarında kısmi albinizm (pigment yokluğu) ve immün yetmezlik izlenir.

Taşıyıcı veziküllerin oluşumu Ras ve Ran proteinleriyle ilişkili küçük GTP-bağlayan proteinler (Arf ve Sar) tarafından düzenlenir. Arf, Golgi aparatından tomurcuklanan COP1 ve klatrin kaplı veziküllerin oluşumunda rol alırken; Sar, ER'den tomurcuklanan COPII kaplı veziküllerin oluşumunda rol oynar. Bu GTP-bağlayan proteinler, hem kargo hem de manto proteinleriyle etkileşime girerek vezikül oluşumunu destekleyen adaptör proteinleri çağırır. Örneğin, **Şekil 11.36**, Arf'ın klatrin kaplı vezikül oluşumundaki rolünü şematize eder. Önce *trans*-Golgi zarında yerleşik bir guanin nükleotid değişim faktörü yoluyla Arf/GDP, aktif GTP bağlı formuna dönüştürülür. Arf/GTP, hem kargo seçilimi hem de manto oluşumunun başlatılmasında rol alan bir adaptör proteini bir araya getirir. Bu adaptör protein, özellikle Golgiden çıkış sinyali taşıyan ilişkili transmembran proteinlerin sitozolik bölgelerine bağlanır. Daha önce de tartışıldığı gibi bu transmembran proteinler arasında veziküle yerleşim için seçilmiş olan lümene ait kargo proteinlerinin reseptörleri de bulunur. Bu adaptör protein klatrin'i de kompleks yapısına katarak manto yapısının oluşum sürecini başlatır. Klatrin,





Şekil 11.36 Klatrin kaplı vezikül oluşumu (A) *Trans*-Golgi zarına aktarıldıktan sonra, Arf/GDP bir guanin nükleotid değişim faktörü (Arf/GEF) tarafından Arf/GTP'ye aktive edilir. Arf/GTP membrana bir adaptör proteini çeker. Adaptör protein, hem luminal kargosu vasıtasıyla bir transmembran reseptörünün sitoplazmik kuyruğu ile ilişkiye geçer hem de klatrin mantosunun montajı için bir bağlanma bölgesi oluşturur. Klatrin, birbirleriyle etkileşerek sepet benzeri bir yapı oluşturan 3 protein zincirinden oluşur. Bu sepet benzeri yapı zar bütünlüğünü bozarak vezikül tomurcuklanmasını tetikler. (B) Klatrin kaplı veziküllerin taramalı elektron mikrografisi (Tomas Kirchhausen'in izniyle, Harvard Üniversitesi.)

zar yapısının dışa doğru bombeleşmesini ve tomurcuklanmayı başlatan sepet benzeri bir yapı oluşturarak, vezikül taşınmasında yapısal bir rol oynar.

Vezikül kaynaşması

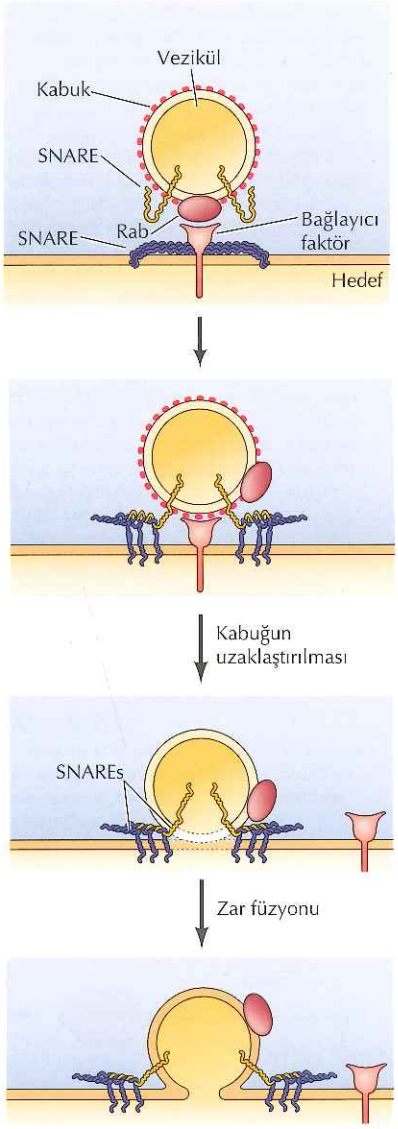
Taşıyıcı bir vezikülün hedefi ile kaynaşması (füzyonu) için iki farklı olayın gerçekleşmesi gerekir. İlk olarak, taşıma veziküllerinin doğru hedef zarı tanıması gerekmektedir. Örneğin, lizozomal enzimleri taşıyan bir vezikülün kargoyu sadece lizozomlara götürmesi gerekir. İkincisi, vezikül içeriğinin hedef organele aktarılması için vezikül ile hedef organel zarlarının birbirleriyle kaynaşması gerekir. Son yıllardaki araştırmalar vezikül kaynaşması için bir model geliştirilmesini sağlamıştır. Buna göre, vezikül ile hedef zar arasındaki özgül tanıma, vezikül ile hedef zarlar üzerindeki proteinler arasındaki etkileşimler ile sağlanmakta ve bunu fosfolipid çift tabakalar arasında kaynaşmayı (füzyon) yönlendiren ek protein-protein etkileşimleri takip etmektedir.

Taşıyıcı veziküller ve hedef zarlar arasındaki ilk etkileşim, **bağlayıcı faktörler** (***tethering factors***) ve küçük-GTP bağlayan proteinler (**Rab** proteinleri) ile düzenlenir. Vezikülle taşımanın farklı aşamalarında işlevsel rolü olan 60'dan fazla Rab proteini tanımlanmıştır (**Tablo 11.1**). Tek tek Rab proteinleri veya Rab protein bileşenleri farklı organeller ve taşıyıcı veziküller için özelleşerek, vezikülle taşımanın özgüllüğünü sağlamada anahtar rol oynarlar. GTP-bağlı aktif formdaki vezikül Rab proteinleri, hedef zarlardaki "bağlayıcı faktörlere" bağlanarak hedef ve vezikül zarları arasındaki ilk köprünün oluşumunu sağlar (**Şekil 11.37**). Bağlayıcı faktörler manto proteinlerine bağlanarak da veziküller ile olan etkileşimlerini güçlendirir. Bunlara ek olarak bu bağlayıcı faktörlerin, vezikül ve hedef zarlardaki **SNARE** adı verilen transmembran proteinlerin kompleks oluşturmasını tetikleyerek zarların kaynaşmasına yol açabildiği düşünülmektedir.

SNARE'ler ilk olarak, James Rothman'ın laboratuvarında, *in vitro* yapılandırılmış memeli hücre vezikülle taşıma sistemlerinin biyokimyasal

Tablo 11.1 Temsili Rab Proteinleri

Rab proteini	Taşıma
Rab1A ve B	ER'den Golgi'ye, Golgi içi
Rab2A ve B	ER'den Golgi'ye
Rab3A-D	Ekzositoz
Rab4A ve B	Endozomdan plazma membranına
Rab5A-C	Erken endozom kaynaşması
Rab6A-C	Endozomdan Golgi'ye, Golgi içi, Golgi'den ER
Rab7A ve B	Geç endozomdan lizozoma
Rab8A ve B	*Trans*-Golgi ağı ve geri dönüşümlü endozomlardan plazma membranına
Rab10	*Trans*-Golgi ağı ve geri dönüşümlü endozomlardan bazolateral plazma membranına
Rab14	*Trans*-Golgi ağı ve geri dönüşümlü endozomlardan apical plazma membranına
Rab22A	Geri dönüşümlü endozomlardan plazma membranına



Şekil 11.37 Vezikül kenetlenmesi ve hedef zarla kaynaşma (füzyon) Vezikül membranında bulunan bir Rab proteini, hedef membran ile ilişkili bir bağlayıcı faktöre bağlanır. Bunu takiben, hedef ve vezikül membranlarındaki SNARE proteinleri aralarında kompleksler oluşturur. SNARE'lerin *coiled-coil* bölgeleri bir fermuar gibi birbirlerine bağlanarak, vezikül ve hedef membranları fiziksel olarak yakınlaştırır ve membranlar kaynaşır.

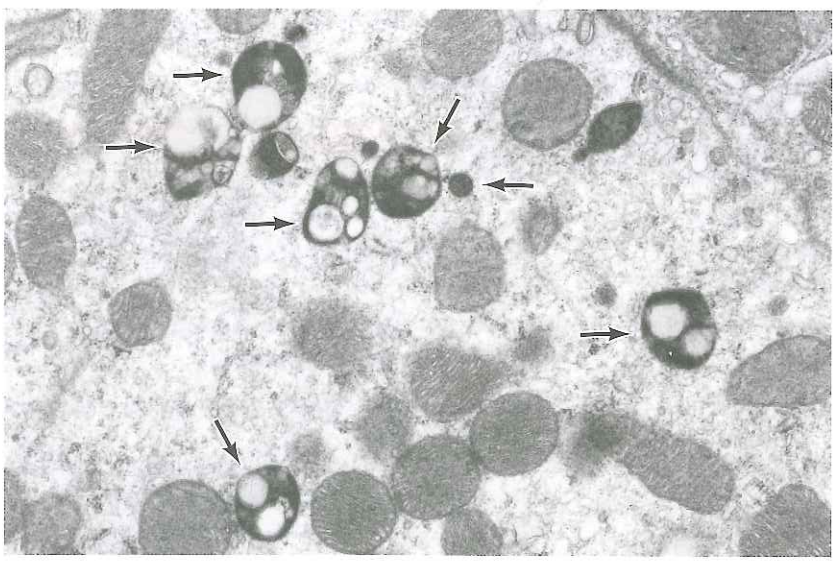
analizleri sonucu tanımlanmıştır. Bu sistemlerdeki vezikül kaynaşmasında görevli proteinlerin analizi sonucu, Rothman ve arkadaşları veziküler kaynaşmanın vezikül ve hedef zarlarda bulunan, spesifik SNARE çiftleri (vezikül SNARE, v-SNARE; hedef SNARE, t-SNARE) tarafından düzenlendiğini savunan bir hipotez ileri sürdüler. Takip eden araştırmalar, vezikül kaynaşması için vezikül ve hedef SNARE'lerin gerektiğini ve SNARE-SNARE bağlanmasının, iki lipid tabakasını, birbirine kaynaşmalarını sağlayacak kadar yakınlaştırmak için gerekli enerjiyi sağladığını kanıtlamıştır. Tüm SNARE proteinleri, nükleer lamin proteinleri gibi bir dolanmış-sarmal (*coiled-coil*) alt birimine sahiptirler (bkz. Şekil 10.4). Laminlerdeki gibi bu bölge diğer dolanmış-sarmal bölgelere sıkıca bağlanmakta; SNARE'leri neredeyse bir fermuar gibi birbirine kenetleyerek, iki zarı, birbirleriyle doğrudan temas kuracak kadar yaklaştırmaktadır. Bu yakınlaşma sonucu lipid çift tabakasında bir kararsızlık oluşur ve iki zarın birbirleriyle kaynaşması gerçekleşir.

Lizozomlar

Lizozomlar, protein, nükleik asit, karbohidrat ve lipid gibi her türlü biyolojik polimeri parçalayacak enzimler içeren, zarla çevrili organellerdir. Lizozomlar hem hücre dışından alınan maddeleri yıkarak hem de hücrenin kullanılmayan/yıpranmış yapılarını sindirerek hücrenin sindirim sistemi olarak işlev görür. En basit formları yoğun yuvarlak vakuoller şeklinde izlenirler; ancak sindirilmek üzere içeriye alınan farklı maddelere bağlı olarak farklı boyut ve şekillerde gözlenebilir (**Şekil 11.38**). Sonuç olarak lizozomlar, farklı hücre içi materyalin yıkımından sorumlu, yapısal çeşitlilik gösteren organeller olarak tanımlanabilir.

Lizozomal asit hidrolazlar

Lizozomlar; protein, DNA, RNA, polisakkarid ve lipidleri hidrolize eden 60



Şekil 11.38 Bir memeli hücresinde lizozom ve mitokondrinin elektron mikrografı Lizozomlar okla gösterilmiştir. Sindirim için içeriye alınan maddelerin çeşitliliğinden kaynaklanan, büyüklük ve şekil farklılıkları göze çarpmaktadır.

Moleküler Tıp

Gaucher Hastalığı

Hastalık

Gaucher hastalığı, lizozomların normal koşullarda parçalayabildikleri maddeleri yıkamamaları sonucu gözlenen lizozomal depo hastalıklarının en yaygın olanıdır. Yıkılamayan bileşiklerin birikimi, lizozomların sayı ve boyutlarında artışa ve sonuç olarak, hücrelerin işlev görememesi nedeniyle organ patolojilerine yol açmaktadır. Hastalığın, şiddet derecesi ve sinir sistemi tutulumu yönünden farklılıklar gösteren üç tipi bulunmaktadır. En sık gözlenen formunda (tip 1) sinir sistemi tutulmamıştır, hastalık kendini dalak ve karaciğer büyümesi ve kemik lezyonları ile gösterir. Gaucher hastalığının bu formuna sahip pek çok hastada ciddi semptomlar izlenmemekte ve yaşam süreleri etkilenmemektedir. Tip 1 hastalık Ashkenazi Yahudi toplumunda oldukça yaygın olup, 1/1000 oranında izlenmektedir. Hastalığın daha şiddetli formları (tip 2 ve 3), hem Yahudi hem de Yahudi olmayan topluluklarda, çok daha nadirdir. En yıkıcı olan, yaşamın ilk aylarında yaygın nörolojik tutulum gösteren ve erken yaşta ölüme götüren, tip 2 hastalığıdır. Tip 3 hastalığı, şiddeti açısından tip 1 ve 2 arasında olup, demans ve spastik bulguları da içeren nörolojik semptomlar 10 yaş civarında ortaya çıkar.

Moleküler ve Hücresel Temel

Eksikliği Gaucher hastalığına yol açan lizozomal enzim glukoserebrosidazdır. Glukoserebrosidaz, glukozilseramid'in, glukoz ve seramide ayrışmasını katalizler (şekle bakınız). Bu enzim eksikliği 1965'de gösterilmiş ve sorumlu gen 1985'de klonlanmıştır. O günden bu yana, Gaucher hastalığına yol açan 100'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. İlginç bir şekilde, oluşan mutasyonun özelliğine göre hastalık şiddeti büyük ölçüde öngörülebilmektedir. Örneğin, göreceli olarak korunmuş bir asparajin yerine serin amino asitinin gelmesine neden olan bir mutasyon, tip 1 hastalığına yol açarken; prolinin lösin yerine geçmesine yol açan bir mutasyon, daha şiddetli enzim yetmezliklerine neden olur ve tip 2 veya 3 hastalığına yol açar.

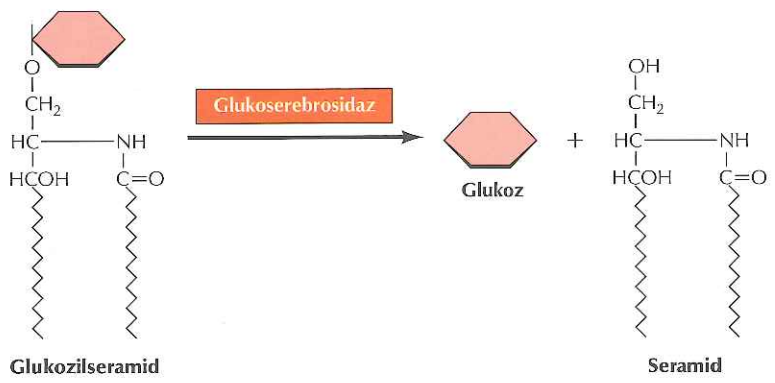
Hastalığın çok nadir gözüken tip 2 ve 3 formları dışında, Gaucher hastalığında etkilenen hücreler yalnızca makrofajlardır. İşlevleri, yaşlı ve hasarlı hücreleri fagositoz yoluyla ortadan kaldırmak olduğundan, makrofajlar normalde lizozomlarda parçalanan, yüksek miktarda lipid içeren bileşikleri fagositoz yoluyla içlerine almaktadır. Glukoserebrosidaz yetmezliği, hastalıktan birinci derecede etkilenen organların karaciğer ve dalak olmasıyla uyumlu olarak, özellikle bu organlarda bulunan makrofajlarda belirgindir.

Önlem ve Tedavi

Gaucher hastalığı, var olan bir enzim eksikliğini düzeltmek amacıyla, dışarıdan yerine koyma (*replacement therapy*)tedavisi ile düzeltilebilen hastalıklara iyi bir örnektir. Lizozomal depo hastalıklarının tedavisine bu yaklaşım, ilk olarak 1960'larda Christian de Duve tarafından dışarıdan verilen enzimlerin endositoz yoluyla hücre içine alınıp lizozomlara taşınabileceği fikri temel alınarak-ileri sürülmüştür. Tip 1 Gaucher hastalığında, tek hedef hücrenin makrofajlar olması nedeniyle bu yaklaşım özellikle ilgi görmektedir. 1970'lerde, makrofajların hücre yüzeyinde, hücre dışı glikoproteinler üzerinde yer alan mannoz birimlerini bağlayan reseptörler taşıdıkları ve mannoz içeren proteinleri endositoz yoluyla içselleştirdikleri keşfedildi. Bu gözlem, mannoz birimleri eklenerek değiştirilen glukoserebrosidaz'ın, dışarıdan verildiğinde özgül olarak makrofajları hedefleyebileceğini düşündürdü. İlk geliştirilen tedavi olan insan plasentasından hazırlanan enzimin uygun şekilde değiştirilmesi ve uygulanması sonucu klinik çalışmalar, bu yöntemin Gaucher hastalığının tedavisindeki etkinliğini açıkça göstermiştir. Gaucher hastalığı için bu tedavi stratejisi 1991 yılında onaylanmıştır. Takip eden yıllarda, rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak enzimin üretimine geçilmiş; bu şekilde hem çok miktarda üretim mümkün olmuş hem de hepatit virüsleri gibi enfektif ajanlarla kontaminasyon riski ortadan kaldırılmıştır.

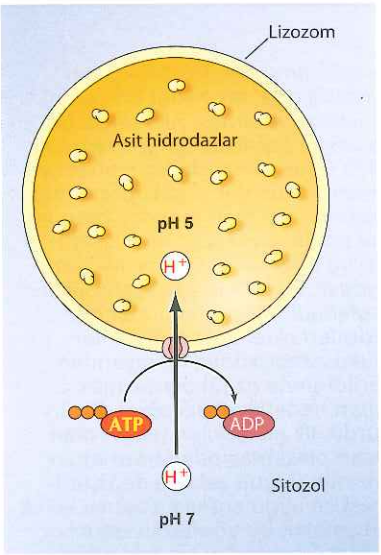
Kaynaklar

Deegan, P. B. and T. M. Cox. 2012. Imiglucerase in the treatment of Gaucher disease: a history and perspective. *Drug Des. Dev. Ther* 6: 81 -106.



Gaucher hastalığındaki enzim eksikliği glikozilseramidin glukoz ve seramide hidrolizini engeler.

kadar farklı yıkım enzimini barındırırlar. Bu enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, etkilenen kişilerde lizozom içi materyalin birikimi nedeniyle, **lizozomal depo hastalıkları** olarak tanımlanan 30'dan fazla genetik hastalıktan sorumludur. Bu hastalıkların çoğu, lizozomal enzimlerden sadece birinin



Şekil 11.39 Lizozom organizasyonu Lizozomlar, kendi içlerindeki asidik pH'da aktif olup, sitozolun nötür pH'sında inaktif olan pek çok çeşitte asit hidrolazlar barındırır. Lizozomların iç asidik pH'sı, sitoplazmadaki protonları ATP hidrolizi ile lizozom içerisine pompalayan lizozomal membrandaki proton pompalarının aktivasyonu sonucudur.

yetmezliğinin sonucudur. Örneğin, Gaucher hastalığı (bu tür hastalıkların en yaygın gözleneni) glikolipidlerin yıkımı için gereken bir enzimi kodlayan gendeki mutasyon sonucu ortaya çıkar. İlgi çekici bir istisna, Golgi aygıtında lizozomal enzimlerin mannoz-6-fosfat ile işaretlenmesinin ilk adımını katalizleyen enzimdeki bozukluk sonucu gözlenen I-hücre hastalığıdır (bkz. Şekil 11.28). Bu mutasyon sonucu, lizozomal enzimlerim lizozom içerisine alınmasında genel bir başarısızlık izlenir.

Lizozomal enzimlerin çoğu lizozom içi asit pH'da (5 civarı) aktif olan, ancak sitoplazmanın nötral pH'sında (7,2 kadar) aktivite göstermeyen asit hidrolazlardır (**Şekil 11.39**). Lizozomal hidrolazların asidik pH'ya gereksinmeleri, sitozol içeriğinin istenmeyen sindirimine karşı çifte korunma sağlamaktadır: lizozomal zar parçalansa dahi serbest kalan asit hidrolazlar, sitoplazmanın nötral pH'sında etkisizdirler. Lizozomlar iç asidik pH'larını korumak için aktif olarak H^+ iyon (proton) konsantrasyonlarını yüksek tutmak zorundadır. Bu durum lizozozomal zarda yerleşik, sitozolden lizozom içine aktif olarak protonları taşıyan bir proton pompası ile sağlanır. Lizozom içinde sitozolden yaklaşık 100 kat daha yoğun bir H^+ konsantrasyonunu sağlayan bu pompalar için, ATP hidrolizi sonucu ortaya çıkan enerjiye ihtiyaç bulunmaktadır.

Endositoz ve lizozom oluşumu

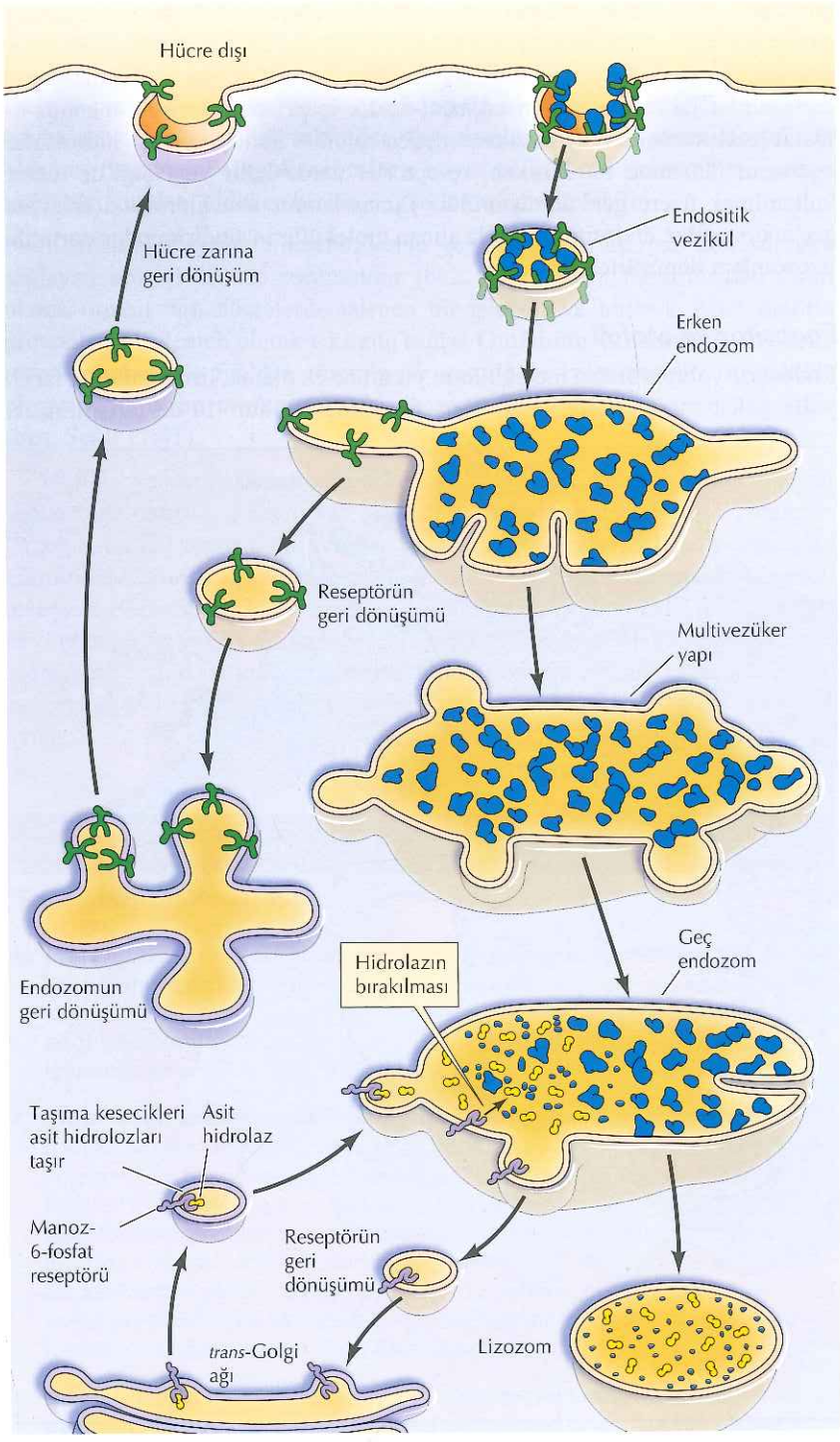
Lizozomların başlıca işlevlerinden biri, Bölüm 14'de detaylarıyla tartışılacak olan, **endositoz** yoluyla hücre dışından alınan maddelerin sindirimidir. Ancak lizozomların endositoz yoluyla alınan maddelerin sindirimindeki rolleri sadece işlevle değil, oluşumlarıyla da ilişkilidir. Lizozomlar, plazma zarından endositoz yoluyla alınmış maddeleri içeren endozomların, *trans*-Golgi ağından tomurcuklanan taşıma vezikülleri ile kaynaşması sonucu oluşur.

Endozomlar, lizozomal ve diğer salgı proteinlerinin işlendiği salgı yolağı ile, hücre dışı moleküllerin hücre yüzeyinden içeriye alındığı endositik yolağın kesişim noktasını oluşturmaktadır. (**Şekil 11.40**). Bu bölümde daha önce de bahsedildiği gibi hayvan hücrelerinde üç tip endozom bulunur: erken endozomlar, geri dönüşümlü endozomlar ve geç endozomlar. Erken endozomlar membrandan endositoz yoluyla oluşan veziküllerle kaynaşır. Burada tekrar plazma membranına geri döndürülecek moleküller ile yıkıma uğrayacak moleküller ayrıştırılır. Tekrar plazma membranına geri döndürülecek moleküller (örneğin Bölüm 14'de tartışılan hücre yüzey reseptörleri) geri dönüşümlü endozomlara aktarılır ve hedefleri olan hücre zarına gönderilir. Buna karşın yıkıma uğrayacak olan moleküller, multi-veziküler oluşumlara, oradan da geç endozomlara aktarılır

Lizozomal asit hidrolazlar da *trans*-Golgi ağından geç endozomlara taşınır. Endozom olgunlaşması (erken endozomdan, geç endozom oluşum süreci) sırasındaki önemli değişikliklerden biri, iç pH'nın 5,5 civarına indirilmesidir. Endozom içi pH'nın düşürülmesi, *trans*-Golgi ağından lizozomal asit hidrolazların transferini tetikleyen anahtar konumundadır. Önceden tartışıldığı

Bilgi İçin

Sıtma tedavisinde kullanılan klorokin yüksüz bir molekül olduğundan fizyolojik pH'da hücre membranlarından geçebilmektedir. Asidik pH'da klorokin (+) yüklü hale gelir ve sivrisineğin sindirim vakuollerinde (lizozomlara eşdeğer yapılar) birikir. İlacın parazite karşı aktivitesinde, klorokinin bu sindirim vakuollerinde yüksek yoğunluklara ulaşmasının sorumlu olduğu düşünülmektedir.

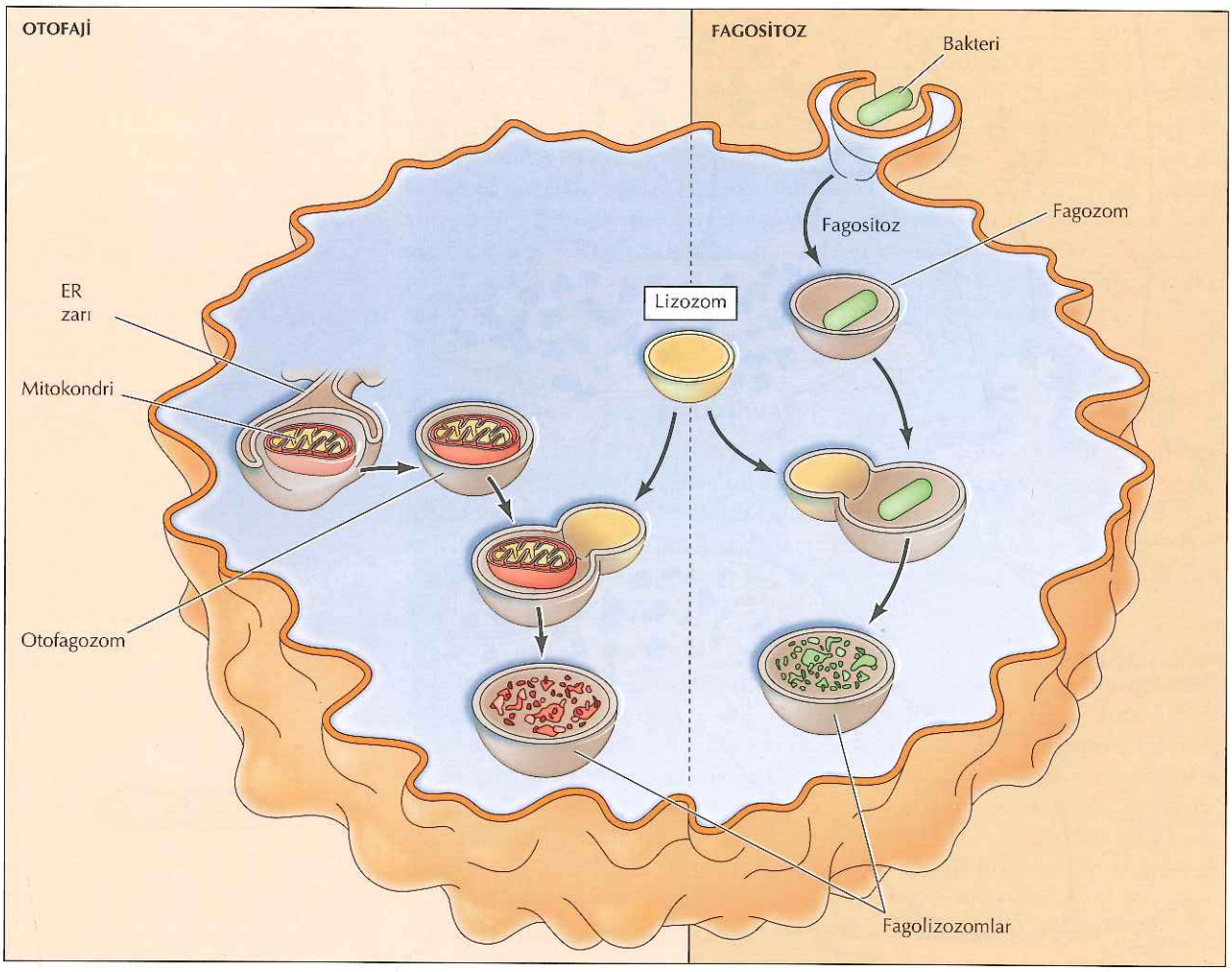


Şekil 11.40 Endositoz ve lizozom oluşumu Hücre dışındaki moleküller, erken endozomlar ile kaynaşan endositik veziküller aracılığıyla hücre içine alınır. Membran reseptörleri geri dönüşüm endozomları ile hücre zarına geri gönderilir. Öte yandan erken endozomlar, geç endozomlara ve çok veziküllü (multi-veziküler) yapılara olgunlaşabilir. *Trans*-Golgi ağından gelen ve asit hidrolazları taşıyan veziküller geç endozomlar ile kaynaşarak, onların lizozomal enzimlerini tamamlayarak lizozoma olgunlaşmalarını sağlar. Taşıma vezikülleri geç endozomlar ile kaynaştığında, asit hidrolazlar mannoz-6-fosfat reseptörlerinden ayrılır ve mannoz-6-fosfat reseptörleri *trans*-Golgi ağına geri gönderilir.

gibi asit hidrolazlar *trans*-Golgi ağındaki mannoz-6-fosfat reseptörleri tarafından tanınarak klatrin kaplı veziküllere paketlenir ve içerdikleri mannoz-6-fosfat birimleri nedeniyle lizozomlara hedeflenir. Taşıyıcı veziküllerin geç endozomlar ile kaynaşmasını takiben, asidik iç pH hidrolazların mannoz-6-fosfat reseptöründen ayrılmasına neden olur. Sonuç olarak hidrolazlar endozom lümenine bırakılırken, reseptörler zarda kalır ve Golgi'de tekrar kullanılmak üzere geri dönüştürülür. Tamamlanmış asit hidrolaz içeriği ile geç endozomlar, endositoz yoluyla alınan moleküllerin sindiriminden sorumlu lizozomlara dönüşürler.

Fagositoz ve otofaji

Endositoz yoluyla alınan moleküllerin yıkımına ek olarak, lizozomlar iki farklı yolla gelen materyali de sindirirler: fagositoz (Bölüm 14'de tartışılmıştır)



Şekil 11.41 Fagositoz ve otofajide lizozomlar Fagositozda büyük partiküller (örneğin bakteriler) fagositik vakuollere ya da fagozomlara alınırlar. Otofajide, sitoplazmanın bölümleri veya iç organeller (mitokondri gibi) ER'den köken alan membran parçaları ile çevrelenerek otofagozomları oluşturur. Hem fagozomlar hem de otofagozomlar lizozomlar ile kaynaşarak içeriklerinin sindirildiği büyük fagolizozozomları meydana getirir.

ve otofaji (Bölüm 9'da tartışılmıştır) (Şekil 11.41). **Fagositoz**da, makrofaj gibi özelleşmiş hücreler, bakteri, hücre artıkları ve vücuttan uzaklaştırılması gereken yaşlanmış hücreler gibi büyük partikülleri içlerine alıp parçalarlar. Bu tür partiküller, daha sonra içeriklerinin sindirilmesi için lizozomlarla kaynaşacak olan fagositik vakuoller (**fagozomlar**) içerisine alınır. Bu şekilde oluşmuş lizozomlar **(fagolizozomlar),** boyut ve şekilleri sindirdikleri içeriğe bağlı olduğundan, oldukça büyük ve farklı yapılarda olabilir.

Lizozomlar ayrıca, hücrenin kendi yapı taşlarının aşamalı dönüşümünü sağlayan **otofaji**'den de sorumludur (bkz. Şekil 9.48). Fagositozdan farklı olarak otofaji tüm hücrelerde izlenen bir işlevdir ve hücrede uzun ömürlü proteinlerin kademeli olarak yıkımını sağlar. Otofajinin ilk adımı, bir organelin (örn., mitokondri) ER'den türemiş bir zar ile çevrelenmesidir. Bu şekilde oluşan vezikül (bir **otofagozom**) bir lizozom ile kaynaşır ve içeriği sindirilir (bkz. Şekil 11.41).

Otofaji sadece hücrenin kendi yapı taşlarının sürekli yenilenmesini sağlamakla kalmaz, gelişim süreçlerinde ve stres yanıtları ile de düzenlenir. Örneğin, otofaji yoğun doku yeniden modellemesi ve hücresel komponentlerin yıkımını gerektiren, böcek metamorfozu gibi gelişimsel süreçlerde çok önemli rol oynar. Buna ek olarak besin kaynağı yokluğunda da otofaji aktive olur. Besin yokluğunda otofaji, o an için gerekli olmayan makromoleküllerin yıkımını sağlayarak yapı taşlarının yeniden kullanımını sağlar. Ancak, Bölüm 18'de de tartışıldığı gibi farklı koşullarda otofaji programlanmış hücre ölümünde de rol oynar.

ÖZET

Endoplazmik Retikulum

- ***Endoplazmik retikulum ve protein salgılanması:*** Protein tasnifinde ilk dallanma noktası endoplazmik retikulumdur. Memeli hücrelerinde salgılanan, lizozom veya plazma zarına hedeflenen proteinler zara bağlı ribozomlarda sentezlenir ve sentez sürerken granüllü ER içerisine aktarılırlar. Bkz. **Video 11.1.**

- ***Proteinlerin endoplazmik retikuluma hedeflenmesi:*** Proteinler, translasyonları sürerken veya sitozolde translasyonları tamamlandıktan sonra ER'ye hedeflenebilir. Memeli hücrelerinde çoğu protein, zara bağlı ribozomlarda protein translasyonu sürerken ER içine aktarılırlar. Salgılanacak proteinlerin sentezlendiği ribozomlar, polipeptid zincirinin amino ucundaki sinyal dizileri ile endoplazmik retikuluma hedeflenirler. Bu aşamadan sonra, uzayan polipeptid zincirleri, protein kanalları aracılığıyla, ER içine aktarılırlar ve sinyal dizisinin kesilmesiyle lümen içerisinde serbestleşirler. Bkz. **Animasyon 11.1.**

- ***Proteinlerin ER zarına katılması:*** Plazma zarının veya ER, Golgi aygıtı ve lizozom zarlarının integral proteinleri öncelikle ER zarına gömülürler. ER lümenine aktarılmak yerine bu proteinler uzayan polipeptidlerin transferini durduran ve zarı kat eden α-sarmal yapılar aracılığıyla ER zarına çapalanırlar.

- ***ER 'de protein katlanması ve işlenmesi:*** Polipeptid zincirleri doğru üç boyutlu yapılarına ER içerisinde katlanırlar. ER ayrıca, *N*-bağlı glikozillenmenin gerçekleştiği ve GPI çapalarının eklendiği yerdir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

endoplazmik retikulum (ER), granüllü ER, granülsüz ER, salgı vezikülü, salgı yolağı

sinyal dizisi, mikrozom, sinyal tanıyan partikül (SRP), SRP RNA, SRP reseptörü, translokon, sinyal peptidaz

protein disülfid izomeraz, glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapası

ÖZET

- ***ER'de kalite kontrolü:*** Salgılanacak proteinlerin çoğu ilk denemede doğru katlanamaz. Şaperonlar yanlış katlanmış proteinleri algılarlar ve onları katlanma yolağına geri kazandırır. Doğru katlanamayan proteinler, salgı yolağından çıkarılarak, yıkım için işaretlenirler. Katlanmamış protein yanıt yolağı, ER içerisindeki katlanmamış protein miktarını izler ve kapasitenin aşılmaması için gerekli moleküler düzenlemeleri uyarır.
- ***Düz ER ve lipid sentezi:*** ER, ökaryot hücrelerde lipid sentezinin gerçekleştiği başlıca merkezdir. Yağda çözünen ilaçların toksisitesinin giderilmesi ile lipid metabolizmasının aktif olduğu hücrelerde düz ER oldukça yoğun olarak bulunur.
- ***Protein ve lipidlerin ER'den dışarı çıkışları:*** Protein ve lipidler, ER'den Golgi aygıtına veziküller aracılığıyla aktarılır. Hedefleyen diziler, dışarı gönderilecek proteinlerin Golgi'ye taşınacak veziküller içerisine seçici olarak paketlenmesini sağlar. ER'de yerleşecek proteinler kendilerini, bir geri dönüşüm yolağı ile Golgi'den ER'ye geri gönderecek sinyal dizileri ile işaretlenmişlerdir.

Golgi Aygıtı

- ***Golgi'nin organizasyonu:*** Golgi aygıtı, lipid ve polisakkarid sentezinin yanı sıra, proteinlerin işlenmesi ve sınıflandırılmasında görev alır. Proteinler ER'den *cis*-Golgi kompatmanına taşınırlar. Proteinler mediyal ve *trans*-bölümlerden, *trans*-Golgi ağına doğru ilerledikçe, geçtikleri bölgelere özgü işlemlere tabi tutulurlar. Proteinler burada endozomlara, plazma zarına veya hücre dışına gönderilmek üzere tasnif edilirler ve veziküllere paketlenirler. Bkz. **Animasyon 11.2.**
- ***Proteinlerin Golgi içerisinde glikozillenmesi:*** Proteinlere ER içerisinde eklenmiş olan N-bağlı oligosakkaridler, Golgi içinde modifiye edilir. Lizozomlara gidecek olan proteinler, özellikle mannoz birimlerinden fosforillenir ve mannoz-6-fosfat, *trans*-Golgi ağından lizozomlara gidecek proteinler için bir hedefleme sinyali olarak işlev görür. Bunlara ek olarak *O*-bağlı glikozillenme de Golgi içerisinde gerçekleştirilir.
- ***Golgideki lipid ve polisakkarid metabolizması:*** Golgi aygıtı, glikolipidlerin, sfingomiyelin ve bitki hücre duvarlarındaki kompleks polisakkaridlerin sentez yeridir.
- ***Proteinlerin tasnifi ve Golgi aygıtından dışarı gönderilmesi (eksport):*** Proteinler *trans*-Golgi ağında tasnif edilip; salgılanmaya, lizozoma, plazma zarına veya maya ve bitki hücre vakuollerine hedeflenmek üzere taşıma veziküllerinde paketlenirler. Polarize hücrelerde proteinler spesifik olarak plazma membranının apikal ya da bazolateral bölgelerine hedeflenirler Bkz. **Videolar 11.2** ve **11:3.**

Vezikülle Taşıma Mekanizması

- ***Vezikülle taşınmayı anlamaya yönelik deneysel yaklaşımlar:*** Vezikülle taşıma mekanizmaları; maya mutantları, hücrelerden bağımsız yapılandırılmış sistemler, sinaptik vezikül araştırmaları ve canlı hücrelerde, GFP işaretli proteinleri kullanarak protein trafiğinin görüntülenmesi ile aydınlatılmıştır.
- ***Kargo seçimi, kaplayıcı proteinler ve vezikül tomurcuklanması:*** Veziküllerin önemli bir kısmının sitoplazmik yüzeyi, vezikül tomurcuklanmasını düzenleyen proteinler ile kaplanmıştır. Taşınacak spesifik moleküller, manto proteinleriyle etkileşen küçük GTP-bağlayan protein ve adaptör protein komplekslerince seçilir. Bkz. **Video 11.4.**

ANAHTAR SÖZCÜKLER

ER-ilişkili yıkım (ERAD), kalneksin, kalretikulin, katlanmamış protein yanıtı (UPR)

flipaz

Golgi aygıtı, Golgi kompleksi, *trans*-Golgi ağı

mannoz-6-fosfat, sinyal yaması

apikal bölge, bazolateral bölge, vakuol

sinaptik vezikül

klatrin, COPI, COPII, COPI-kaplı vezikül, COPII-kaplı vezikül, Klatrin-kaplı vezikül

ÖZET

- ***Vezikül kaynaşması:*** Taşıyıcı vezikül ile hedef zar arasındaki ilk ilişki, "bağlayıcı faktörlerin *tethering factors*" Rab proteinlerine bağlanmasıyla düzenlenir. Bunu takiben, vezikül ve hedef zarlardaki transmembran proteinler arasındaki etkileşim zarların kaynaşması (füzyonu) ile sonuçlanır.

Lizozomlar

- ***Lizozomal asit hidrolazlar:*** Lizozomlar proteinleri, nükleik asitleri, polisakkaridleri ve yağları yıkabilen bir dizi asit hidrolaz içerir. Bu enzimler özellikle lizozom içerisindeki asidik pH'da işlev görürler.
- ***Endositoz ve lizozom oluşumu:*** Endositoz yoluyla alınan hücre dışı moleküller, erken endozomlara aktarılır. Yıkıma uğrayacak moleküller, Golgi'den gönderilen lizozomal asit hidrolazları alarak lizozoma olgunlaşacak olan, geç endozomlara taşınırlar.
- ***Fagositoz ve otofaji:*** Lizozomlar, fagositoz yoluyla alınan büyük partiküllerin yıkımından ve hücrenin kendi yapılarının otofaji yoluyla sindiriminden sorumludur.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

bağlayıcı faktörler, Rab, SNARE

lizozom, lizozomal depo hastalığı

endositoz, endozom

fagositoz, fagozom, fagolizozom, otofaji, otofagozom

Sorular

1. Granüllü ER → Golgi aygıtı→salgı vezikülleri → salgılanan protein olarak özetlenebilecek olan salgı yolağının varlığını gösteren ilk deneysel bulgu neydi?
2. Salgılanacak proteinleri granüllü ER'ye hedefleyen sinyal dizilerinin varlığı, *in vitro* mRNA translasyon deneyleri ile nasıl desteklendi?
3. Polipeptid zincirlerinin ko-translasyonel ve post-translasyonel yer değiştirme (translokasyon) ile endoplazmik retikulum içerisine taşınmaları arasındaki benzer ve farklı yönleri karşılaştırınız.
4. Sec61 ER zarındaki protein kanallarının önemli bir bileşenidir. Sec6l mutant maya hücrelerinde, normal koşullarda Golgi aygıtında yerleşik bir proteinin kaderi ne olur?
5. Glikoproteinlerin karbohidrat grupları neden her zaman hücre dış yüzeyinde lokalize olur?
6. BiP gibi ER yerleşimli bir proteininde bulunan KDEL dizisi mutasyonunun etkisi ne olur? Bu etki KDEL reseptör proteinini inaktive edecek bir mutasyonun etkisiyle ne gibi benzerlik veya farklılıklar gösterir?
7. Lizozomal bir protein lizozoma ne şekilde hedeflenir? Normalde sitozolde lokalize olan bir proteine, onu lizozoma hedefleyen bir sinyalin eklenmesi ne gibi sonuçlar doğurur? Aynı durum, normalde salgılanan bir proteinin yerleşimini nasıl etkiler?
8. Mannoz-6-fosfat birimlerini oluşturan enzimin eksik olduğu I-hücre hastalığında, lizozomal asit hidrolazların hücre içi kaderi ile ilgili beklentileriniz ne olur?
9. Hangi sürecin sonucunda glikolipid ve sfingomiyelin, plazma zarı çift tabakasının iç yaprağına değil de dış yaprağına yerleşir?

Atıf

Hücre

Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

10. Makrofaj lizozomlarında glukoserebrosid birikimi olan bir hasta kliniğinize başvurdu. Tanınız ve önereceğiniz tedavi ne olur?
11. Lizozomlar, sentezlendiği ER'den Golgi aracılığı ile taşınan güçlü hidrolitik enzimler içerirler. Bu enzimler neden bu organellerin bileşenlerine zarar vermez?
12. Hedef membranlar ile vezikül membranları arasında gerçekleşen kaynaşmanın (füzyonun) enerji kaynağı nedir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

(Her ana bölüm için en önemli anahtar derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Endoplazmik Retikulum

Aebi, M., R. Bernasconi, S. Clerc and M. Molinari. 2010. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem. Sci.* 35: 74-82. [R]

Blobel, G. and B. Dobberstein. 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane -bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* 67: 835-851. [P]

Braakman, I. and N.J. Bulleid. 2011. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 80: 71-99. [R]

Chen, S., P. Novick and S. Perro-Novick. 2013. ER structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25: 428-433. [R]

Dancourt, J. and C. Barlowe. 2010. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Ann. Rev. Biochem.* 79: 777-802. [R]

Ferris, S. P., V. K. Kodali and R. J. Kaufman. 2014. Glycoprotein folding and qualitycontrol mechanisms in protein-folding diseases. *Dis. Model Mech.* 7: 331-341. [R]

Goyal, U. and C. Blackstone. 2013. Untangling the web: mechanisms underlying ER network formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 2492-2498. [R

Hegde, R. S. and R. J. Keenan. 2011. Tailanchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 787-798. [R]

Hetz, C. 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 89-102. [R]

Park, E. and T. A. Rapoport. 2012. Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Ann. Rev. Biophys.* 41: 21-40. [R]

Presley, J. F., N. B. Cole, T. A. Schroer, K. Hirschberg, K. J. Zaal and J. Lippincott Schwartz. 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389: 81-85. [P]

Ron, D. and P. Walter. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 519-529. [R]

Sebastian, T. T., R. D. Baldridge, P. Xu and T. R. Graham. 2012. Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 1068-1077. [R]

Shao, S. and R. S. Hegde. 2011. Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell Dev. Boil.* 27: 25-56. [R]

Smith, M. H., H. L. Ploegh and J. S. Weissman. 2011. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* 334: 1086-1090. [R]

van den Berg, B., W. M. Clemens Jr., I. Colllinson, Y. Modis, E. Hartmann, S. C. Harrison and T. A. Rapaport. 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427: 36-44. [P]

Walter, P. and D. Ron. 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334: 1081-1085. [R]

Golgi Aparatı

Armstrong, J. 2010. Yeast vacuoles: more than a model lysosome. *Trends Cell Biol.* 20: 580-585. [R]

Banfiel d, D. K. 2011. Mechanisms of protein retention in the Golgi. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: a005264. [R]

Baranski, T. J., P. L. Faust and S. Kornfeld. 1990. Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. *Cell* 63: 281-291. [P]

De Matteis, M.A. and A. Luini. 2008. Exiting the Golgi complex. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 273-284. [R]

Glick, B. S. and A. Luini. 2011. Models for Golgi traffic: a critical assessment. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3:a005215. [R]

Guo, Y., D. W. Sirkis and R. Schekman. 2014. Protein sorting at the *trans*-Golgi network. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 30: 169-206. [R]

Kienzle, C. and J. von Blume. 2014. Secretory cargo sorting at the *trans*-Golgi network. *Trends Cell Biol.* 24: 584-593. [R]

Lowe, M. 2011. Structural organization of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23: 85-93. [R]

Matsuura-Tokita , K., M. Takeuchi, A. Ichihara, K. Mikuriya and A. Nakano. 2006. Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* 441: 1007-1010. [P]

Morriswood, B. and G. Warren. 2013. Stalemate in the Golgi battle. *Science* 341: 1465-1466. [R]

10. Makrofaj lizozomlarında glukoserebrosid birikimi olan bir hasta kliniğinize başvurdu. Tanınız ve önereceğiniz tedavi ne olur?
11. Lizozomlar, sentezlendiği ER'den Golgi aracılığı ile taşınan güçlü hidrolitik enzimler içerirler. Bu enzimler neden bu organellerin bileşenlerine zarar vermez?
12. Hedef membranlar ile vezikül membranları arasında gerçekleşen kaynaşmanın (füzyonun) enerji kaynağı nedir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

(Her ana bölüm için en önemli anahtar derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Endoplazmik Retikulum

Aebi, M., R. Bernasconi, S. Clerc and M. Molinari. 2010. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem. Sci.* 35: 74-82. [R]

Blobel, G. and B. Dobberstein. 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane -bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* 67: 835-851. [P]

Braakman, I. and N.J. Bulleid. 2011. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 80: 71-99. [R]

Chen, S., P. Novick and S. Perro-Novick. 2013. ER structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25: 428-433. [R]

Dancourt, J. and C. Barlowe. 2010. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Ann. Rev. Biochem.* 79: 777-802. [R]

Ferris, S. P., V. K. Kodali and R. J. Kaufman. 2014. Glycoprotein folding and qualitycontrol mechanisms in protein-folding diseases. *Dis. Model Mech.* 7: 331-341. [R]

Goyal, U. and C. Blackstone. 2013. Untangling the web: mechanisms underlying ER network formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 2492-2498. [R

Hegde, R. S. and R. J. Keenan. 2011. Tailanchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 787-798. [R]

Hetz, C. 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 89-102. [R]

Park, E. and T. A. Rapoport. 2012. Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Ann. Rev. Biophys.* 41: 21-40. [R]

Presley, J. F., N. B. Cole, T. A. Schroer, K. Hirschberg, K. J. Zaal and J. Lippincott Schwartz. 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389: 81-85. [P]

Ron, D. and P. Walter. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 519-529. [R]

Sebastian, T. T., R. D. Baldridge, P. Xu and T. R. Graham. 2012. Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 1068-1077. [R]

Shao, S. and R. S. Hegde. 2011. Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell Dev. Boil.* 27: 25-56. [R]

Smith, M. H., H. L. Ploegh and J. S. Weissman. 2011. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* 334: 1086-1090. [R]

van den Berg, B., W. M. Clemens Jr., I. Colllinson, Y. Modis, E. Hartmann, S. C. Harrison and T. A. Rapaport. 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427: 36-44. [P]

Walter, P. and D. Ron. 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334: 1081-1085. [R]

Golgi Aparatı

Armstrong, J. 2010. Yeast vacuoles: more than a model lysosome. *Trends Cell Biol.* 20: 580-585. [R]

Banfiel d, D. K. 2011. Mechanisms of protein retention in the Golgi. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: a005264. [R]

Baranski, T. J., P. L. Faust and S. Kornfeld. 1990. Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. *Cell* 63: 281-291. [P]

De Matteis, M.A. and A. Luini. 2008. Exiting the Golgi complex. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 273-284. [R]

Glick, B. S. and A. Luini. 2011. Models for Golgi traffic: a critical assessment. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3:a005215. [R]

Guo, Y., D. W. Sirkis and R. Schekman. 2014. Protein sorting at the *trans*-Golgi network. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 30: 169-206. [R]

Kienzle, C. and J. von Blume. 2014. Secretory cargo sorting at the *trans*-Golgi network. *Trends Cell Biol.* 24: 584-593. [R]

Lowe, M. 2011. Structural organization of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23: 85-93. [R]

Matsuura-Tokita , K., M. Takeuchi, A. Ichihara, K. Mikuriya and A. Nakano. 2006. Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* 441: 1007-1010. [P]

Morriswood, B. and G. Warren. 2013. Stalemate in the Golgi battle. *Science* 341: 1465-1466. [R]

Pfeffer, S. R. 2009. Multiple routes of protein transport from endosomes the *trans* Golgi network. *FEBS Letters* 583: 3811-3816. [R]

Stanley, P. 2011. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3:a005199. [R]

Xiang, L., E. Etxeberria and W. Van den Ende. 2013. Vacuolar protein sorting mechanisms in plants. *FEBS J.* 280: 979-993. [R]

Veziküller Taşınma Mekanizması

Bröcker, C., S. Engelbrecht-Vandre and C. Ungermann. 2010. Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Current Biol.* 20: R943- R952. [R]

Cai, H., K. Reinisch and S. Ferro-Novick. 2007. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev. Cell* 12: 671-682. [R]

Carmosino, M., G. Valenti, M. Caplan and M. Svelto. 2010. Polarized traffic towards the cell surface : how to find the route. *Biol. Cell* 102: 75-91. [R]

Faini, M., R. Beck, F. T. Wieland and J. A. G. Briggs. 2013. Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends Cell Biol.* 23: 279-288. [R]

Fries, E., and J. E. Rothman. 1980. Transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein in a cell-free extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3870-3874. [P]

Gillingham, A. K. and S. Munro. 2007. The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 579-611. [R]

Hong, W. J. and S. Lev. 2014. Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends Cell Biol.* 24: 35-43. [R]

Hutagalung, A. H. and P. J. Novick. 2011. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.* 91: 119-149. [R]

Mellman, I.and S.D. Emr. 2013. A Nobel Prize for membrane traffic: vesicles find their journey's end. *J. Cell Biol.* 203: 559-561. [R]

Novick, P., C. Field and R. Schekman. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21: 205-215. [P]

Pucadyil, T. J. and S. L. Schmid. 2009. Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science* 325: 1217-1220. [R]

Söllner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318-324. [P]

Zanetti, G., K. B. Pahuja, S. Studer, S. Shim and R. Schekman. 2012. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nature Cell Biol.* 14: 20-28. [R]

Lizozomlar

Bissig, C. and J. Gruenberg. 2013. Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 5:a016816 [R]

Coutinho, M. F., M. J. Prata and S. Alves. 2012. Mannose-6-phosphate pathway: A review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Mol. Genet. Metab.* 105: 542-550. [R]

Forgac, M. 2007. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 917-929. [R]

Luzio, J. P., P.R. Pryor and N. A. Bright. 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 622-632. [R]

Neufeld, E. F. 1991. Lysosomal storage diseases. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 257-280. [R]

Rubinsztein, D. C., T. Shpilka and Z. Elazar. 2012. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Current Biol.* 22: R29-R34. [R]

Saftig, P. and J. Klumperman. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 623-635. [R]

Settembre, C., A. Fraldi, D. L. Medina and A. Ballabio. 2013. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 283-296. [R]

Shen, H.-M. and N. Mizushima. 2014. At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends Biochem. Sci.* 39: 61-71. [R]

Weidberg, H., E. Shvets and Z. Elazar. 2011. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Ann. Rev. Biochem.* 80: 125-156. [R]

BÖLÜM 12

Mitokondri, Kloroplastlar ve Peroksizomlar

Mitokondri 447

Kloroplastlar ve Diğer Plastidler 458

Peroksizomlar 467

Moleküler Tıp

Mitokondri Hastalıkları: Leber'in Kalıtsal Optik Nöropatisi 452

Moleküler Tıp

Peroksizom Biyogenez Hastalıkları 472

Protein tasnifi ve taşınmasına katılımlarının yanı sıra, sitoplazmik organeller çeşitli metabolik aktivitelerin yer aldığı özel bölmeler oluştururlar. Metabolik enerji üretimi tüm hücrelerin en önemli aktivitesidir ve sitoplazmik iki organel, özel olarak, enerji metabolizmasına ve ATP üretimine ayrılmıştır. Mitokondriler, lipid ve karbohidratların yıkımından elde edilen kullanılabilir enerjinin büyük bölümünün üretiminden sorumludur. Kloroplastlar güneş ışığından yakalanan enerjiyi, hem ATP'yi hem de CO_2 ile H_2O'dan karbohidratların sentezlenmesi için gerekli redükleyici gücü oluşturmak üzere kullanır. Bu bölümde tartışılan üçüncü organel, peroksizom, yağ asitlerinin yıkımını ve fotosentez yan ürünlerinin metabolizmasını da kapsayan çeşitli farklı metabolik yolaklarla ilgili enzimleri içerir.

Mitokondri, kloroplast ve peroksizom, önceki bölümde ele alınan organellerden sadece işlevleriyle değil, yapılanma mekanizmalarıyla da ayrılırlar. Peroksizom, mitokondri ve kloroplasta gidecek proteinler, zara bağlı ribozomlarda sentezlenip endoplazmik retikuluma aktarılmak yerine, sitozoldeki serbest ribozomlarda sentezlenerek hedef organele, tamamlanmış polipeptid zinciri olarak aktarılırlar. Mitokondri ve kloroplast, organel içerisinde transkribe olup proteine çevrilen bazı genler içeren, kendilerine ait genoma sahiptirler. Bu nedenle, bu bölümde ele alınan sitoplazmik organellere protein dağıtımı, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, lizozom ve plazma zarını birbirine ilişkilendiren veziküller taşıma yolağından oldukça farklıdır.

Mitokondri

Mitokondriler ökaryot hücrelerde metabolik enerjinin üretiminde kritik bir role sahiptir. Bölüm 3'de gözden geçirildiği gibi, lipid ve karbohidratların yıkımından elde edilen ve oksidatif fosforilasyon işlemiyle ATP'ye dönüştürülen kullanılabilir enerjinin büyük bölümünün üretiminden sorumludurlar. Mitokondri proteinlerinin çoğu serbest sitozolik ribozomlarda sentezlendikten sonra, hedefleyen özel sinyaller aracılığıyla organele alınırlar. Ayrıca mitokondriler, daha önce tartışılmış olan sitoplazmik organeller arasında, tRNA'ları, rRNA`ları ve bazı mitokondri proteinlerini kodlayan kendine ait bir DNA'ya sahip olmasıyla benzersizdir. Mitokondrilerin yapılanması böylece, nükleer genom tarafından kodlanan ve sitozolden alınan proteinlerle birlikte, kendi genomları tarafından kodlanan ve organel içinde sentezlenen proteinleri de gerektirir.

Video 12.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v12.1
Mitokondri Ağları
Birçok hücrede mitokondriler birbiri ile ilişkili geniş bir ağın bir parçası olarak bulunurlar.

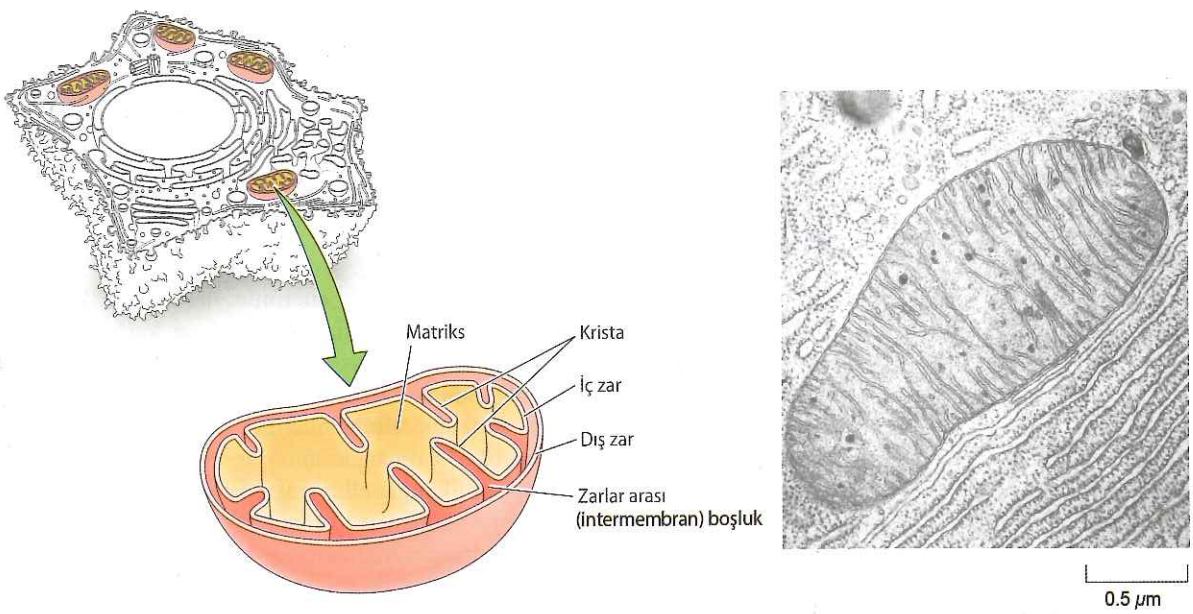
Video 12.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v12.2
Mitokondri Dinamikleri
Sürekli gerçekleşen füzyon ve fisyon olayları mitokondri ağını yeniden düzenler, morfoloji ve fonksiyonunu değiştirir.

Mitokondri organizasyonu ve işlevi

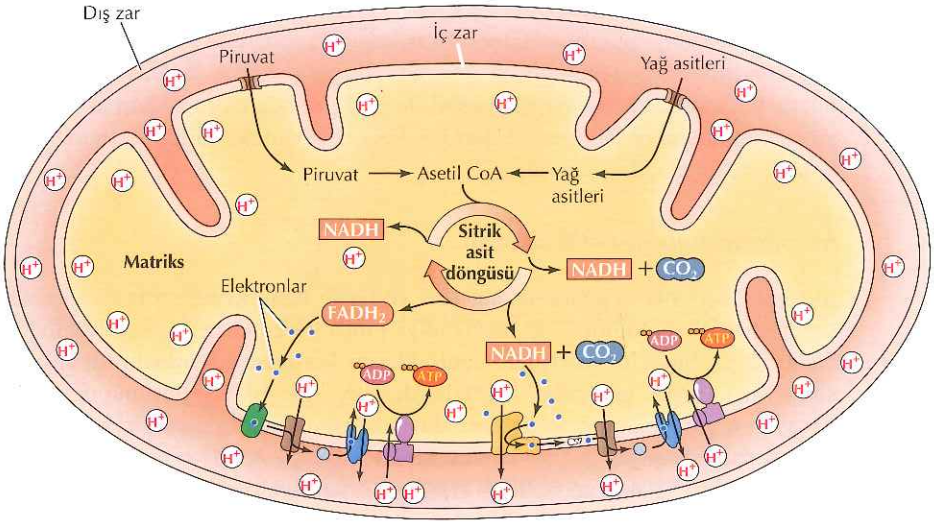
Mitokondriler, bir intermembran boşluk ile birbirinden ayrılmış iç ve dış mitokondri zarlarından oluşan bir çift-zar sistemiyle çevrilidirler (**Şekil 12.1**). İç zar organelin içine (ya da **matriks**'e) doğru uzanan çok sayıda kıvrımlar **(krista)** oluşturur. Matriks ve iç zar mitokondrinin en önemli işlevsel bölümleridir ve bu bileşenlerin her biri farklı işlevsel roller üstlenmiştir.

Matriks, mitokondriyal genetik sistemlerle birlikte, ana oksidatif metabolizma tepkimelerinden sorumlu enzimleri de içerir (**Şekil 12.2**). Bölüm 3'de görüldüğü gibi, hayvan hücrelerinde glukoz ve yağ asitlerinin oksidatif yıkımı başlıca metabolik enerji kaynağıdır. Glukoz metabolizmasının, glukozun piruvata dönüştürüldüğü başlangıç evreleri (glikoliz) sitozolde gerçekleşir (bkz. Şekil 3.2). Daha sonra piruvat mitokondriye aktarılır ve burada tümüyle CO_2'e yükseltgenmesiyle glukoz metabolizmasından büyük miktarda kullanılabilir enerji (ATP) elde edilir. Bu, piruvatın öncelikle, daha sonra sitrik asit döngüsü yoluyla CO_2'e yıkılacak olan, asetil CoA'ya oksitlenmesini gerektirir (bkz.Şekil 3.3 ve 3.4). Yağ asitlerinin oksidasyonu ile de asetil CoA elde edilir (bkz. Şekil 3.5) ve benzer şekilde mitokondri içerisinde sitrik asit döngüsüyle metabolize edilir. Sitrik asit döngüsü enzimleri (mitokondri matriksinde bulunur), hem karbohidratların hem de yağ asitlerinin oksidatif yıkımındaki temel oyuncularıdır.

Asetil CoA'nın CO_2'e oksidasyonu NAD^+ ve FAD'ın, sırasıyla, NADH ve $FADH_2$'ye indirgenmesiyle eşleşir. Oksidatif metabolizmadan türetilen enerjinin çoğu, mitokondri iç zarında gerçekleşen oksidatif fosforilasyon süreciyle (Bölüm 3'de detaylı olarak tartışılmıştır) üretilir. NADH ve $FADH_2$'den çıkan yüksek-enerjili elektronlar zarda yerleşik bir dizi taşıyıcıdan geçerek moleküler oksijene aktarılır (bkz. Şekil 3.6 ve 3.7). Bu elektron taşınma reaksiyonlarından çıkan enerji, zarın iki yanında oluşan bir proton gradientinde depolanmış potansiyel enerjiye dönüştürülür ve daha sonra bu, ATP sentezini beslemek için kullanılır. Böylece, mitokondri iç zarı başlıca ATP



Şekil 12.1 Mitokondrinin yapısı Mitokondri, iç ve dış zarlardan oluşan bir çift-zar sistemi ile çevrilidir. İç zarın katmanları (krista) matrikse doğru uzanır.



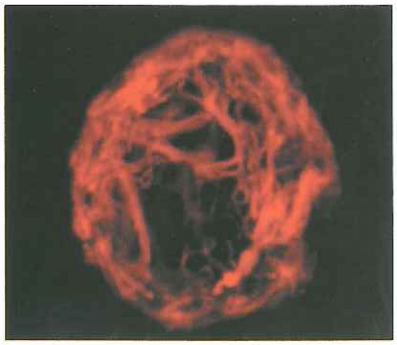
Şekil 12.2 Mitokondride oksidatif metabolizma Piruvat ve yağ asitleri sitozolden alınır ve mitokondri matriksinde asetil CoA ya dönüşür. Asetil CoA, daha sonra, NAD^+ ve FAD'ın sırasıyla NADH ve $FADH_2$'ye indirgenmesi eşliğinde, sitrik asit döngüsü ile CO_2'ye yükseltgenir. NADH ve $FADH_2$'den gelen yüksek enerji, elektronları iç zardaki bir seri taşıyıcı üzerinden zar üzerinden proton gradiyentinin oluşumuna eşlik eden, moleküler oksijene aktarılır. Proton gradienti üzerinde depolanan enerji daha sonra ATP sentezini gerçekleştirmek üzere kullanılır.

Bilgi İçin

Mitokondri dış zarının bütünlüğü programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli rol oynar (Bkz. Bölüm 18)

üretim bölgesini simgeler ve bu kritik görev, yapısından kaynaklanır. Öncelikle, yüzey alanı kristaları oluşturan kıvrılmalarla önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca, mitokondri iç zarı alışılmamış derecede yüksek oranda (%70'den fazla) protein içerir ki, bunlar oksidatif fosforilasyonun yanı sıra, metabolitlerin (örn., pirüvat ve yağ asitleri) sitozol ile mitokondri arasında taşınımı için de gereklidir. Bunlardan başka, iç zar birçok iyon ve küçük molekül için geçilemezdir ve bu durum, oksidatif fosforilasyonu sağlayan proton gradientinin kalıcılığı bakımından kritik bir özelliktir.

İç zarın aksine mitokondri dış zarı küçük moleküller için yüksek oranda geçirgendir. Bunun nedeni, 1000 dalton'dan küçük moleküllerin serbest difüzyonuna olanak veren kanalları oluşturan ve **porin** olarak adlandırılan proteinler içermesidir. Bu nedenle, zarlar arası boşluğun bileşimi iyonlar ve küçük moleküller yönünden sitozole benzerdir. Sonuç olarak, mitokondri iç zarı küçük moleküllerin sitozolden matrikse geçişine işlevsel bir engel oluşturur ve oksidatif fosforilasyonu yürüten proton gradientinin devamlılığını sağlar.



Şekil 12.3 Mitokondri ağı Kırmızı floresan protein (RFP) ile işaretlenmiş mitokondri proteinini eksprese eden bir hücrenin floresan mikroskobu görüntüsü. Mitokondriler birbiri ile bağlantılı bir ağ yapısı oluşturmaktadır. (Jennifer Lippincott-Schwartz ve Kasturi Mitra'nın izni ile.)

Hücresel enerjinin ana kaynağı olarak, mitokondrinin etkin şekilde fonksiyonlarını yerine getirmesi, hücre canlılığı için kritik öneme sahiptir. Mitokondrilerin, sinir hücrelerindeki sinapslarda gözlendiği üzere, birçok hücrede yüksek enerji kullanımının olduğu bölgelerde, seçici bir şekilde konumlandırılmasını gerektirir. Buna ek olarak, mitokondriler durağan organeller olmayıp sürekli birbirleriyle kaynaşır ve bölünürler. Birçok hücrede mitokondriler, birbirine bağlı bir ağın parçası olarak bulunur (Şekil 12.3). Sürekli gerçekleşen füzyon ve fisyon olayları, hücre içerisindeki

Bilgi İçin

Hemen hemen bütün mitokondriler maternal kalıtım gösterdiğinden, insan maternal soyununda en yakın ve ortak kadın atamız olan "Mitokondriyel Havva'ya" kadar takip edilmesi mümkündür.

bu mitokondri ağını yeniden yapılandırır, mitokondrilerin morfolojisini ve fonksiyonunu modifiye eder. Mitokondriyel füzyon, hücre içerisindeki mitokondriler arasındaki genetik materyelin değişimini sağlar. Fizyon ise hücre bölünmesi sırasında mitokondrinin yavru hücrelere dağılmasında ve yüksek miktarda enerji üretimi gereken bölgelere mitokondrinin taşınmasının kolaylaştırılmasında önemlidir.

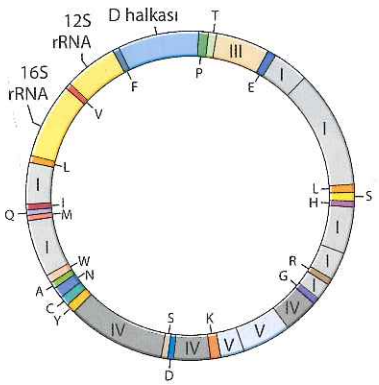
Mitokondrinin genetik sistemi

Mitokondriler hücre genomundan ayrı ve farklı olan, kendilerine ait genetik sistem içerirler. Bölüm 1'de incelendiği gibi mitokondrilerin, kendilerinden daha büyük hücreler içerisinde canlılıklarını koruyarak **(endosimbiyoz)** bir simbiyotik ilişki geliştiren bakterilerden evrimleştikleri düşünülmektedir. Yaşayan organizmaların genomları arasında mitokondri genomuna en benzer olan serbest yaşayan α-proteobakterilerin yaklaşık 7000 protein kodlayan genomlarıdır. Alfa-proteobakteri gibi, bir hücre içi paraziti olan *Rickettsia prowazekii* bir hücre içi daha küçük genoma sahiptir ve yaklaşık 830 protein kodlayan gen içerir. Mitokondrilere benzer şekilde *Rickettsia prowazekii* de sadece ökaryotik hücrelerin içerisinde çoğalabilir fakat mitokondrilerden farklı olarak halen kendi genlerinin çoğunun transkripsiyon ve translasyonunu gerçekleştirir.

Mitokondrilerin genomları, bakterilerinki gibi, genellikle dairesel DNA molekülleridir ve organel başına çok sayıda kopyaları bulunur. Büyüklükleri farklı türler arasında çok değişkendir. Günümüz mitokondri genomları, çoğu oksidatif fosforilasyon sisteminin bileşeni olan, az sayıda protein kodlar. Buna ek olarak mitokondri genomları, mitokondri içerisindeki protein kodlayan sekansların translasyonu için gerekli olan bütün ribozomal RNA'ları ve transfer RNA'ların çoğunu da kodlamaktadır. Diğer mitokondriyel proteinler, atasal mitokondri genomundan nükleusa aktarılan nükleer genler tarafından kodlanır.

İnsan ve birçok diğer hayvan mitokondrilerinin genomları yalnızca 16 kb iken, mayada (yaklaşık 80 kb) ve bitkilerde (200 kb'dan fazla) çok daha büyük mitokondri genomları bulunur. Ancak, bu daha büyük mitokondri genomlarına kodlamayan diziler hakimdir ve önemli derecede daha fazla genetik bilgi içerdikleri söylenemez. Örneğin, *Arabidopsis thaliana* bitkisinin mitokondri genomu yaklaşık olarak 370 kb olmasına karşın, sadece 31 protein kodlar. Bu da insan mitokondri DNA'sının kodladığının iki katından sadece biraz daha fazladır.

İnsan mitokondri genomu elektron taşınması ve oksidatif fosforilasyonla ilişkili 13 protein kodlar (**Şekil 12.4**). Bu proteinleri kodlayan mitokondri genlerinin transkripsiyon ve translasyonu mitokondri içerisinde, organelin kendine ait ribozom ve tRNA'ları ile gerçekleşir. İnsan mitokondri DNA'sı, organel genomundan kodlanan proteinlerin sentezi için gerekli olan 16S ve 12S rRNA'ları ile 22 tRNA kodlar. Bu iki rRNA, hayvan ve maya mitokondri



Şekil 12.4 İnsan mitokondri genomu Genom solunum kompleksleri I, III, IV veya V elemanlarının sentezleyen, 13 protein kodlayan diziyi içerir. Ek olarak , genomda 16S ve 12S rRNA genleri ile 22 tRNA gen yer alır. Bu tRNA'lara karşılık gelen amino asitlerin bir harfle tanımlanan kodları gösterilmiştir. Genomdaki "D halkası" olarak tanımlanan bölge, bir DNA replikasyon orjini ve transkripsiyon başlama bölgesi içerir.

Tablo 12.1 Evrensel ve Mitokondriyal Genetik Kodlar Arasındaki Farklar

Kodon	Evrensel Kod	İnsan Mitokondri Kodu
UGA	Dur	Trp
AGA	Arg	Dur
AGG	Arg	Dur
AUA	Ile	Met

Not: Diğer kodonlar maya ve bitki mitokondrilerinde evrensel koddan farklıdır.

ribozomlarının tek RNA içeriğini oluştururken bakteri ribozomlarında üç rRNA (23S,16S ve 5S) bulunmaktadır. Bitki mitokondri rRNA'ları ise, 5S'lik üçüncü bir rRNA kodlar. Hayvan mitokondrilerinde tRNA'ların tümü organel tarafından kodlanırken, bitki ve protozoaların mitokondrileri organel genomu yanı sıra nükleer genomdan kodlanan tRNA'ları alıp kullanmalarıyla farklılık gösterirler. Mitokondri genomu tarafından kodlanan rRNA ve tRNA'ların aksine, ribozomal proteinler ve translasyon faktörleri dahil olmak üzere transkripsiyon ve translasyon için gereken tüm proteinleri nükleer genler kodlar.

Mitokondri genomunca kodlanan az sayıdaki tRNA mitokondri genetik sisteminin önemli bir özelliğine ışık tutar: hem prokaryotik hem de ökaryotik hücreler tarafından kullanılan "evrensel" genetik koddan farklı bir genetik kod kullanımı bulunmaktadır (**Tablo 12.1**). Bölüm 4'de tartışıldığı gibi, 64 üçlü kodon olasılığı vardır ve bunlardan 61 tanesi proteinlerin yapısına giren 20 değişik amino asidi kodlar (bkz.Tablo 4.1). Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerdeki tRNA'ların çoğu mRNA'daki birden fazla kodonu tanıyabilir. Bunun nedeni, tRNA'daki antikodon ile belirli bir komplementer kodonun üçüncü pozisyonu arasında hatalı eşleşmeye olanak veren "*wobble*"dır (bkz. Şekil 9.3). Yine de, wobble kurallarına göre evrensel kodu çevirmek için en az 30 farklı tRNA gerekir. İnsan mitokondri DNA'sı ise sadece 22 tRNA çeşidi kodlar ve bunlar mitokondri mRNA'larının translasyonunda kullanılan yegane tRNA'lardır. Bu olgu, tRNA antikodonundaki U'nun, dört kodonun tek bir tRNA tarafından tanınmasını sağlayacak şekilde, mRNA'nın üçüncü kodon pozisyonundaki dört bazdan herhangi biriyle eşleşebilmesi sayesinde gerçekleşir. Ayrıca, mitokondride bazı kodonlar evrensel koddan farklı amino asitleri belirtirler.

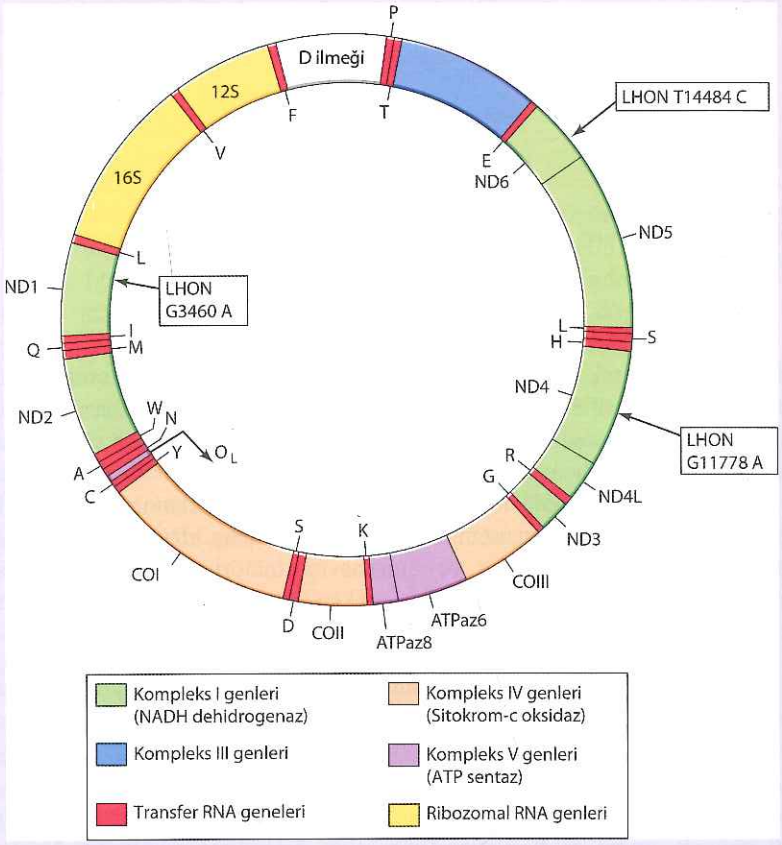
Nükleer genom DNA'sı gibi mitokondri DNA'sı da, genellikle organele zarar veren mutasyonlardan etkilenir. Döllenmiş yumurtadaki mitokondrilerin hemen hepsi, spermden değil oositten kazanıldığı için, mitokondri DNA'sındaki germ-hattı mutasyonlar bir sonraki nesle anne tarafından aktarılır. Bu tür mutasyonlar bazı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Örneğin, körlükle sonuçlanan bir hastalık olan Leber'in kalıtımsal optik nöropatisi, elektron taşıma zincirinde yer alan bileşikleri kodlayan mitokondri genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanabilmektedir. Ayrıca, bireyin yaşam sürecinde mitokondri DNA'larında mutasyonların birikmesinin yaşlanmaya katkısı olduğu belirtilmektedir.

Moleküler Tıp

Mitokondri Hastalıkları: Leber'in Kalıtımsal Optik Nöropatisi

Hastalık

Leber'in kalıtsal optik nöropatisi (LHON), optik sinirlerin dejenerasyonu nedeniyle körlükle sonuçlanan, kalıtsal nadir bir hastalıktır. Görme kaybı genellikle 15 ile 35 yaşlar arasında ortaya çıkar ve genellikle hastalığın tek belirtisidir. LHON nedeni olan genetik bozukluğu alan tüm bireyler hastalığı geliştirmez ve dişiler erkeklerden daha düşük sıklıkta etkilenirler. Erkekleri etkileme eğilimi LHON'un X'e bağlı bir hastalık olduğu fikrini verebilir. Ancak durum farklıdır, çünkü erkekler LHON'u hiçbir zaman çocuklarına aktarmazlar. Aksine LHON kalıtımı tamamen anne geçişlidir. Bu özellik, döllenmiş yumurtanın sitoplazmasının hemen hemen tümüyle oositten edinilmesi nedeniyle, LHON'un nükleer değil sitoplazmik kalıtılmasının sonucudur.



Moleküler ve Hücresel Temel

Douglas Wallace ve arkadaşları 1988'de LHON hastalarının mitokondri DNA'sında bir mutasyon tanımladılar. Bu mutasyon (11778. baz çiftinde) elektron taşıma zincirindeki kompleks I'in (NADH dehidrogenaz) altbirimlerinden birini etkilemektedir. Sonrasındaki çalışmalar, mitokondri tarafından kodlanan NADH dehidrogenazın üç altbirimindeki mutasyonların birçok LHON olgusundan sorumlu olduğunu göstermiştir.

LHON'a neden olan mutasyonlar mitokondrinin, oksidatif fosforilasyonu sürdürme ve ATP oluşturma kapasitesini düşürür. Bunun en büyük etkisi oksidatif fosforilasyona en fazla gereksinim duyan dokularda görüleceğinden, mitokondri bileşenlerindeki hatalar, sistemik hastalıktan ziyade belli dokularda klinik belirtilere yol açar. Merkezi sinir sistemi (beyin ve optik sinir dahil) oksidatif metabolizmaya en yüksek düzeyde gereksinim duyar ki bu durum, LHON'dan sorumlu mitokondri DNA'sı mutasyonlarının neden olduğu öncelikli klinik belirtinin körlük olması ile uyumludur. Daha önce de bahsedildiği gibi LHON mutasyonlarının kalıtımı her zaman hastalık gelişimine yol açmaz, mutasyonu taşıyan dişilerin %10'u ve erkeklerin %50'si görme kaybına uğrar. LHON mutasyonu taşıyanlar arasında hastalığın görülme oranındaki bu düşüklüğü açıklayabilecek faktörlerden biri, her hücrede mitokondri DNA'sının, normal ve mutant mitokondrilerin karışımından oluşan binlerce kopyasının bulunuşudur. Hücre bölünmesi sırasında bu mitokondriler yavru hücrelere rastlantısal olarak dağılır, böylece hücre bölündükçe mitokondri populasyonu değişir ve sonuçta, daha az ya da daha çok oranda mutant organele sahip hücreler oluşur. Ancak önemli bir nokta, baskın şekilde mutant mitokondri taşıyan bir çok bireyde hastalığın gelişmemesidir. Bu durum, henüz tanımlanmamış ilave genetik veya çevresel faktörlerin LHON gelişiminde önemli rol oynadıkları izlenimini vermektedir.

Önlem ve Tedavi

LHON'dan sorumlu mitokondri DNA'sındaki mutasyonlarının tanımlanması hastalığın moleküler tanısına olanak vermektedir ki bu da, aile öyküsü olmayan hastaların kesin tanısının oluşturulmasında çok önemli olabilir. Buna karşın, mitokondri DNA'sındaki mutasyonların saptanması, etkilenen ailelerin taranması veya aile planlaması açısından bir değer taşımaz. Bu durum, moleküler analizlerle bir aile bireyinin veya embriyonun mutant mı, doğal-tip allel mi taşıdığının belirlenebildiği, kalıtılan nükleer gen mutasyonlarının belirlenmesindeki yararla çelişir. Bununla birlikte,

Moleküler Tıp

LHON'da büyük miktarda mutant mitokondri bulunur ve anneden tüm çocuklara iletilir. Yukarıda belirtildiği gibi, çocuklardan hepsi hastalığı geliştirmez, fakat bu durum, genetik analizlerle önceden anlaşılamaz.

LHON'a mitokondri DNA'sı mutasyonlarının neden olduğunun anlaşılması, yeni tedaviler için potansiyel olduğunu düşündürür. Yaklaşımlardan biri, elektron taşıma yolağına, süksinat ya da koenzim Q gibi substrat ve kofaktörlerin verilmesiyle oksidatif fosforilasyonu güçlendirmeye yönelik metabolik tedavidir. Alternatif olarak, nöronların sağkalımını destekleyecek antioksidanlar ve faktörler LHON tedavisi için düşünülmektedir. Son olarak, normal bir gen allelini nükleusa yeniden yerleştirme olasılığını da içeren, gen tedavisi stratejileri üzerinde çalışılmaktadır. Mitokondri tarafından kodlanan defektif proteinin yerine geçecek gen ürününü mitokondriye yönlendirmek için, uygun bir hedefleme sinyali eklenmelidir.

Kaynaklar

Brown, M. D., D. S. Voljavec, M.T. Lott, I. MacDonald and D. C. Wallace. 1992. Leber's hereditary optic neuropathy: A model for mitochondrial neurodegenerative diseases. *FASEB J.* 6:2791-2799.

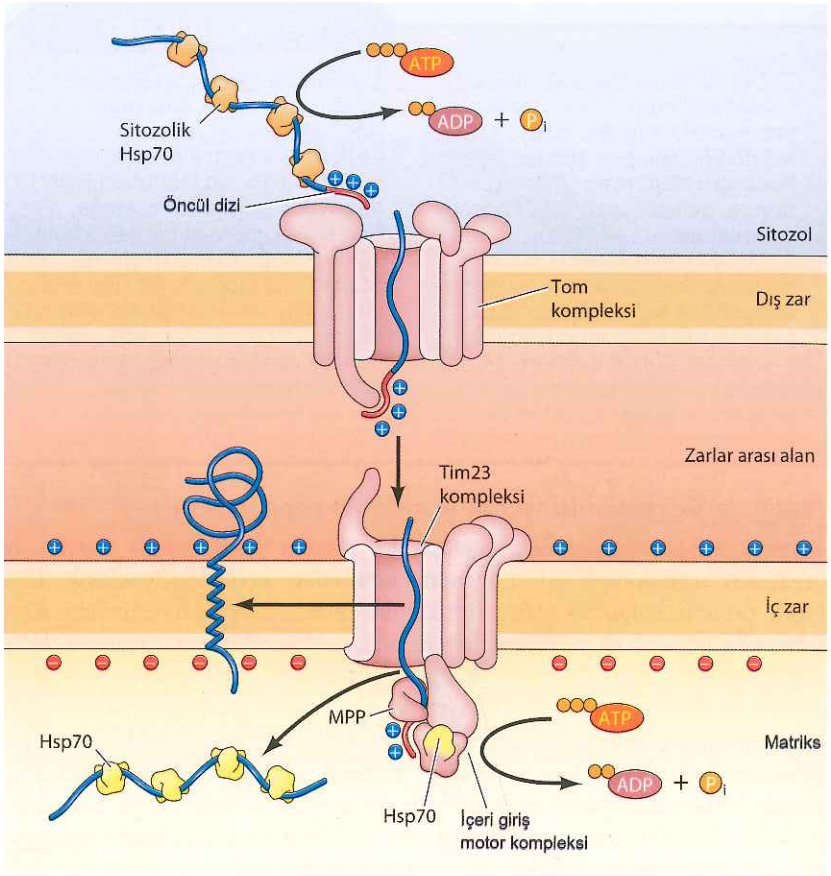
Farrar G. J., N. Chadderton, P. F. Kenna and S. Millington Ward, 2013. Mitochondrial disorders aetiologies, model systems, and candidate therapies. *Trends Genet.* 29: 488-497

Proteinlerin içeri girişi ve mitokondrinin yapılanması

Memeli mitokondri genomu sadece 13 protein kodlamasına karşın, bu organelin içerisinde nükleer genom tarafından kodlanan yaklaşık 1500 farklı protein bulunmaktadır. Mitokondri translasyon düzeneğindeki RNA elemanlarının (rRNA ve tRNA'lar) aksine, çoğu mitokondri genomu, DNA replikasyonu, transkripsiyon ya da translasyon için gerekli proteinleri kodlamaz. Bunun yerine, replikasyon ve mitokondri genlerinin ekspresyonu için gerekli proteinleri kodlayan genler nükleusda bulunur. Nükleus ayrıca, oksidatif fosforilasyon için gerekli birçok mitokondri proteinini ve mitokondri metabolizmasında rol alan enzimlerin (örn; sitrik asit döngüsü enzimleri) tümünü kodlayan genleri içerir. Bu genlerin bazıları mitokondrinin orijinal prokaryotik atasından nükleusa transfer olmuştur.

Nükleer genler tarafından kodlanan proteinler (mitokondri proteinlerinin %99'undan fazlası) serbest sitoplazmik ribozomlarda sentezlenir ve tamamlanmış polipeptid zincirleri halinde mitokondriye alınır. Mitokondrinin çift zar yapısı nedeniyle proteinlerin içeri alınması, polipeptidlerin tek zardan aktarılmasına kıyasla çok daha karmaşıktır. Matriksi hedefleyen moleküller hem dış hem de iç mitokondri zarlarını geçmek zorunda iken, diğer bazı proteinler organel içerisindeki ayrı bölmelere (örn; zarlar arası alan) dağıtılmalıdır. Birkaç farklı sınıf hedefleyici sinyal, proteinlerin farklı bölümlere yönlenmesini sağlar.

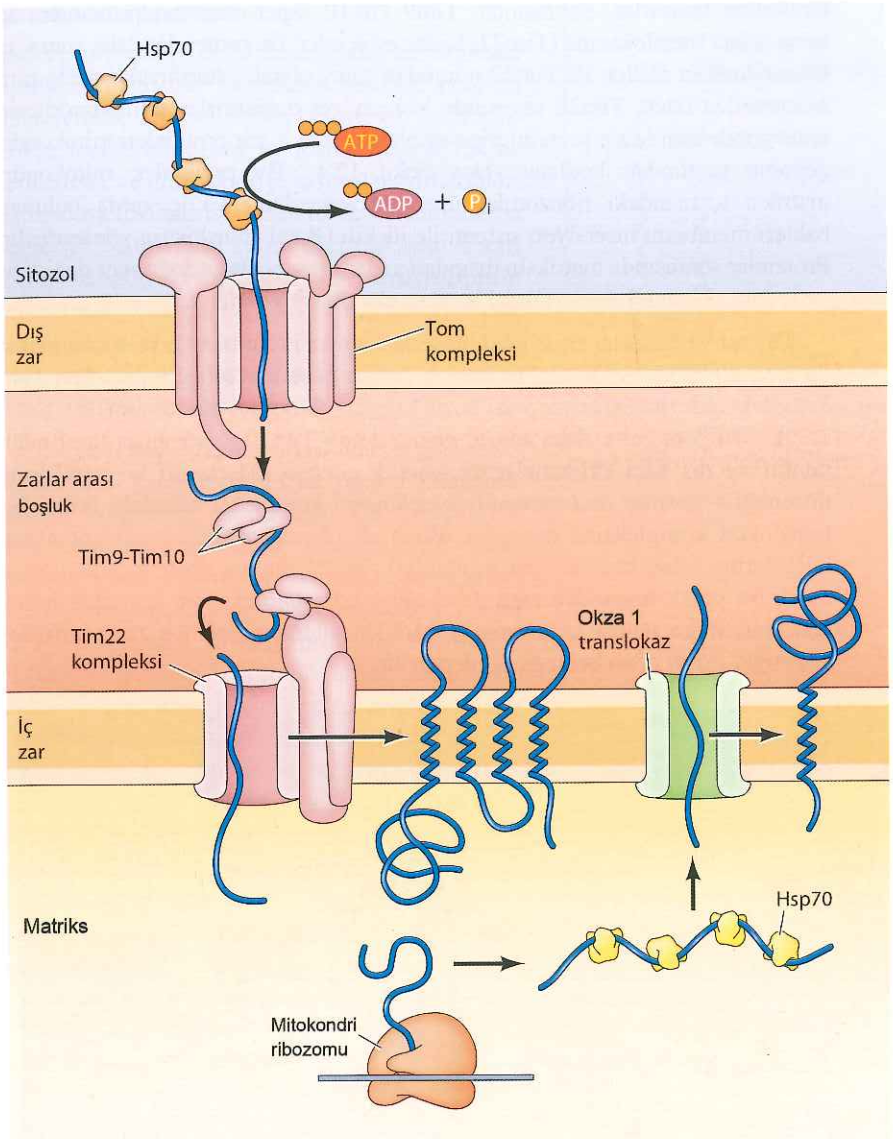
En iyi çalışılmış olan hedef sekansları, proteinlerin mitokondri matriksine alınmasını düzenleyen ve aynı zamanda bazı proteinleri iç zara yönlendiren 15-55 aminoasitten oluşan amino-ucu **öncül dizilerdir** (Şekil 12.5). İlk olarak Gottfried Schatz tarafından tanımlanan mitokondriyal proteinlerin öncül dizileri, genellikle amfipatik alfa heliks içerisinde bulunan ve organele alındıktan sonra proteolitik kesim ile uzaklaştırılan, birçok pozitif yüklü amino asit kalıntısı içermektedir. Protein alımındaki ilk basamak, bu öncül dizilerin mitokondri yüzeyinde bulunan ve dış zardaki translokasyonu düzenleyen bir protein kompleksine tutunmasıdır (dış zardaki translokaz ya da **Tom kompleksi**).Tom kompleksi üzerinden gerçekleşen translokasyonu takiben, bu proteinler iç zarda bulunan ve Tim23 olarak adlandırılan ikinci bir protein kompleksine aktarılırlar (iç zardaki iki değişik translokazdan bir tanesi ya da **Tim kompleksi**). Sonrasında, mitokondriyal matriks proteinleri Tim23 aracılığı ile iç zardan karşıya geçer. Alternatif olarak, bir transmembran sekansa sahip proteinler, Tim23 kanalını yatay olarak geçer ve iç zarın içine yerleşirler.



Şekil 12.5 Öncül dizilere sahip proteinlerin mitokondriye alınması
Proteinler, mitokondrinin dış zarında bulunan Tom kompleksine amino ucunda pozitif yüklü amino asitler içeren öncül diziler ile hedeflenir. Tom kompleksinden geçişi takiben öncül diziler, iç zardaki Tim23 kompleksine bağlanır. Matrikste, Hsp70 şaperonu bulunduran içeri giriş (import) motor kompleksi iç zardan protein translokasyonunu yönlendirmek için ATP hidrolizini kullanır. Transmembran bölgelere sahip bazı proteinler, Tim23'den iç zara doğru yatay olarak çıkarlar. Mitokondri matriksine yönelen proteinler, katlanmalarına yardımcı olan çözünür Hsp70 şaperonları ile birleşir. Ön diziler, mitokondri matriksini işleyici peptidaz (MPP) aracılığı ile ayrılır.

Öncül diziler içeren proteinlerin Tim23 aracılığı ile translokasyonu, elektron aktarımı sırasında iç mitokondriyal zarın her iki yanında oluşan elektrokimyasal potansiyele gereksinim duyar. Bölüm 3'de tartışıldığı gibi, yüksek enerjili elektronların NADH ve $FADH_2$'den moleküler oksijene taşınması, mitokondri matriksindeki protonların zarlar arası alana aktarılmasıyla eş zamanlı yürür. Protonlar yüklü partiküller olduğundan bu aktarım, matriks negatif olacak şekilde, iç zarın iki yanında bir elektrik potansiyeli geliştirir (bkz. Şekil 3.8). Bu elektrik potansiyeli, dışarıdan protein alımı sırasında pozitif yüklü öncül dizinin translokasyonunu sağlar.

Mitokondri zarından taşınabilmesi için, proteinlerin kısmen de olsa katlanmamış olmaları gerekir. Bu nedenle, mitokondriye protein alımı, taşımada görevli zar proteinlerinin yanı sıra moleküler şaperonları da gerektirir (bkz. Şekil 12.5). Sitozolik kısımda, Hsp70 şaperon ailesinin üyeleri, proteinleri



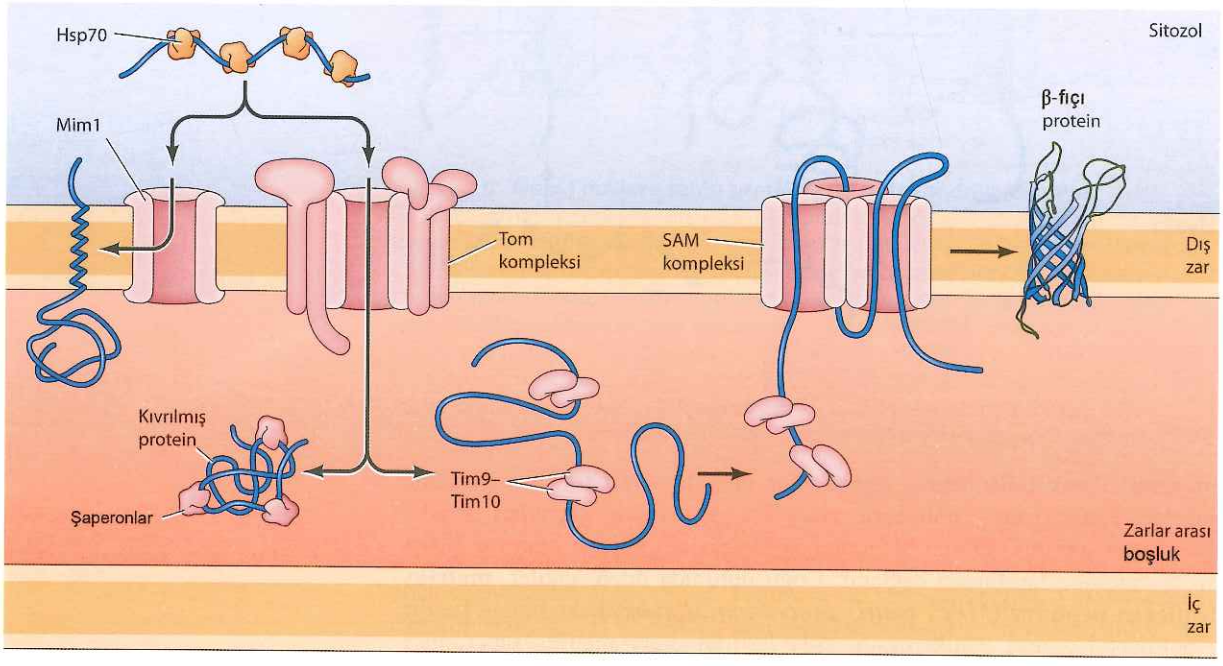
Şekil 12.6 Mitokondri iç zarına protein hedeflenmesi Çoklu transmembran bölümlere sahip iç zar proteinleri N-ucu öncül diziler yerine iç sinyal dizilere sahiptir. Dış zardan translokasyonun ardından, bu proteinler zarlar arası boşlukta bulunan hareketli Tim9-Tim10 şaperonları aracılığı ile bağlanırlar. Bu da onları iç zardaki Tim22 kompleksine transfer eder. İç transmembran diziler translokasyonu durdurur ve protein iç zara yatay olarak aktarılır. Bazı iç zar proteinleri mitokondri genomu tarafından kodlanır. Bu proteinlerin translasyonu matrikste bulunan mitokondri ribozomları üzerinde gerçekleştirilir ve Okza 1 translokaz tarafından iç zara hedeflenir.

hem kısmi olarak katlanmamış yapıda tutar, hem de onları Tom kompleksine tanıtırlar. Katlanmamış polipeptit zincirleri, iç zardan geçtikleri sırada, protein içeri girişini yürüten bir motor kompleksinin parçası olan bir başka Hsp70 şaperonu tarafından bağlanır. Çoğu durumda öncül diziler, **matriks işlemleyici peptidaz (*MPP: matrix processing peptidase*)** tarafından kesilir ve polipeptid zinciri, katlanmasını kolaylaştıran diğer matriks şaperonları tarafından bağlanır.

Proteinler iç membrana sadece öncül diziler üzerinden değil, başka sinyaller ile de hedeflenirler (Şekil 12.6). İç zardaki proteinlerin çoğu, mitokondriler ve sitozol arasında nükleotid ve iyon değişiminde taşıyıcı görevi gören, membranı çoklu-geçen transmembran proteinlerdir. Bu proteinlerin öncül dizileri yoktur fakat bunun yerine birçok iç mitokondri giriş (import) sinyali içerirler. Bu diziler ile işaretlenmiş olan proteinler dış zarı Tom kompleksi aracılığı ile geçer. Ancak Tim23'e aktarılmak yerine zarlar arası boşlukta gezici şaperonlar (Tim9-Tim10)

tarafından tanınırlar. Sonrasında, Tim9-Tim10 şaperonları bu proteinlere iç zarın ikinci translokazına (Tim22) kadar eşlik eder. Bu proteinler daha sonra, iç transmembran diziler ile Tim22 porundan yatay olarak çıkarılmadan ve iç zara eklenmeden önce, Tim22 sayesinde kısmen yer değiştirirler. Mitokondrilerin içine gönderilen iç zar proteinlerine ek olarak, bazı iç zar proteinleri mitokondri genomu tarafından kodlanır (bkz. Şekil 12.4). Bu proteinler, mitokondri matriksi içerisindeki ribozomlar üzerinde sentezlenir ve iç zarda bulunan bakteri membranı insersiyon sistemi ile ilişkili Oxa1 translokaza yönlendirilir. Proteinler sonrasında matriksin dışından zarlar arası boşluğa doğru yer değiştirir ve iç zara eklenmek üzere Oxa1'i yatay olarak terk ederler.

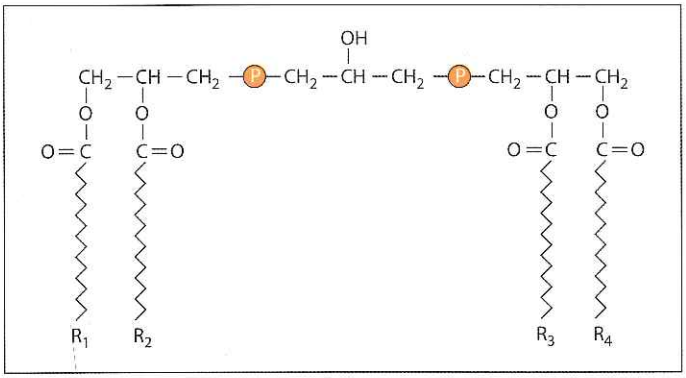
Dış zar ya da zarlar arası boşluğa gidecek olan proteinler de Tom kompleksi ile içeri alınırlar (**Şekil 12.7**). Birçok dış zar proteini (örneğin porinler) Tom kompleksi üzerinden zarlar arası boşluğa geçen β-fıçı proteinleridir (bkz. Şekil 2.35). Bu proteinler daha sonra, gezici Tim9-Tim10 şaperonları tarafından tanınır ve dış zara eklenmelerine aracılık eden SAM (tasnif ve yapılanma düzeneği = *sorting and assembly machinery*) kompleksi adındaki ikinci bir translokon kompleksine taşınırlar. Buna ek olarak, α-sarmal transmembran bölgelerine sahip bazı dış zar proteinleri, Mim1 dış zar proteini aracılığıyla farklı bir yolak üzerinden zara dahil olurlar. Proteinler, Tom kompleksinden çıktıktan sonra belirli şaperonlar tarafından tanınan sisteince zengin diziler aracılığla zarlar arası boşluğa yönlendirilir.



Şekil 12.7 Proteinlerin dış zara ve zarlar arası boşluğa yönlendirilmesi Dış zara gidecek olan tek transmembran bölgeye sahip proteinler, Mim1 dış zar proteini üzerine yerleştirilir. Dış zardaki β-fıçı protein öncüleri, Tom kompleksi üzerinden aktarılır ve zarlar arası boşluktaki Tim9-Tim10 şaperon proteinleri aracılığı ile bağlanırlar. Sonrasında, SAM (tasnif ve yapılandırma düzeneği: *sorting and assembly machinery*) adındaki ikinci translokon kompleksine yönlendirilir ve dış zar içine yerleştirilirler. Zarlar arası boşluğa gidecek olan proteinler Tom kompleksi aracılığı ile transloke edilir ve zarlar arası alandaki belirli şaperonlar tarafından tanınırlar.

Mitokondri lipidleri

Sadece proteinler değil mitokondri zarlarındaki lipidlerin çoğu da sitozolden getirilir. Hayvan hücrelerinde, sfingolipidler, kolesterol, fosfatidilkolin, fosfatidilinozitol ve fosfotidilserin ER'de sentezlenir ve mitokondriye taşınırlar. Mitokondri daha sonra fosfatidilserinden fosfatidiletanolamin sentezler. Mitokondri ayrıca dört yağ asidi zinciri içeren ve nadir bir fosfolipid olan **kardiyolipinin** sentezini de katalizler (**Şekil 12.8**). Kardiyolipin, zar boyunca proton akışını bir miktar kısıtlayarak oksidatif fosforilasyonun etkinliğini arttırmak üzere mitokondrinin iç zarında yerleşiktir.

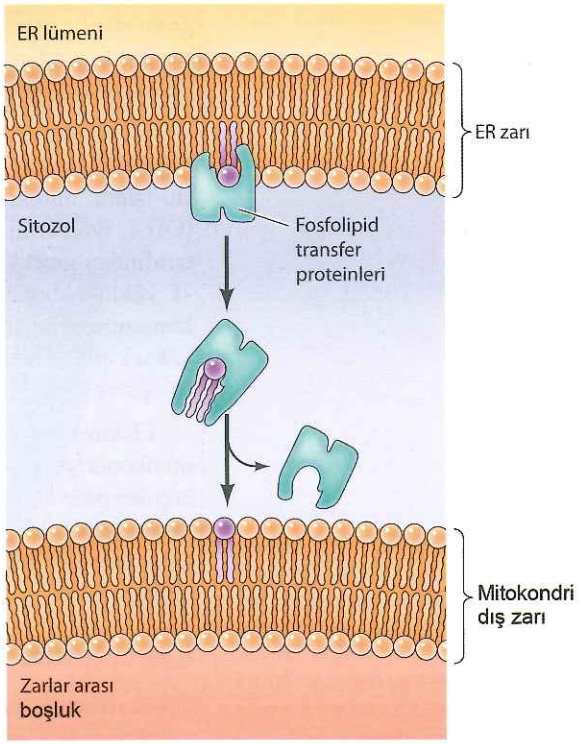


Şekil 12.8 Kardiyolipinin yapısı Dört yağ asidi zinciri içeren nadir "ikili" bir fosfolipid olan kardiyolipin öncelikle iç mitokondri zarında bulunur.

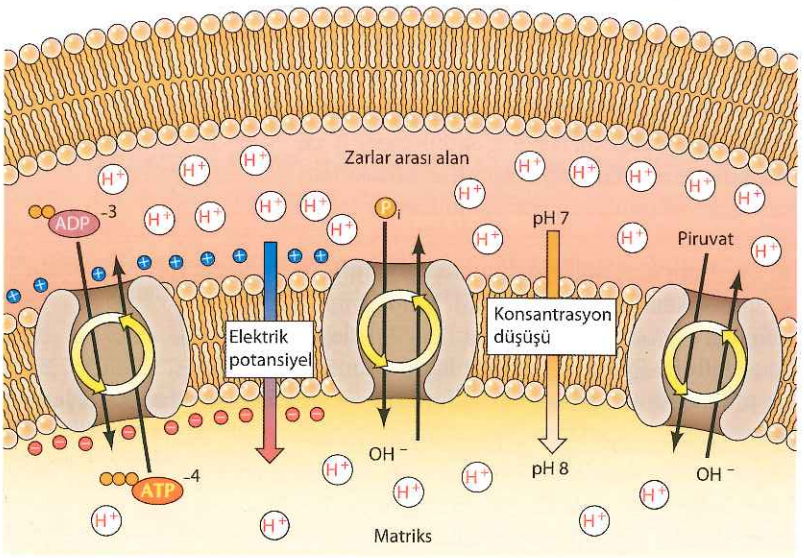
ER ve mitokondri arasında lipidlerin geçişi, her iki hücresel yapının birbiri ile yakın etkileşimde olduğu bölgelerde gerçekleşir. Bu geçişin ER membranından fosfolipid moleküllerini seçip çıkaran eden **fosfolipid transfer proteinleri** üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir (**Şekil 12.9**). Sonrasında lipidler proteinin hidrofobik bağlanma bölgesine gömülü halde sitozoldeki aköz ortamdan geçip mitokondri zarına ulaştığında serbest kalır. Lipidler, mitokondrinin dış ve iç zarları arasında,bu zarların birbirleri ile temasta olduğu noktalardan değiş tokuş edilirler.

Metabolitlerin iç membran boyunca taşınması

Mitokondrinin metabolik enerji oluşturmadaki fonksiyonunun gerçekleşebilmesi için küçük moleküllerin mitokondrinin içine ve dışına doğru etkin şekilde taşınması gerekmektedir. Örneğin, mitokondrinin içinde sentezlenen ATP'nin sitozole taşınması ve ATP sentezinin sürekliliği için ADP ve P_i'nin sitozolden içeriye alınması gereklidir. Mitokondrinin dış zarı küçük moleküllere serbest şekilde geçirgendir. Ancak iç zardaki proteinlerin çoğu küçük molekül taşıyıcılarıdır (bkz. Şekil 12.6). Küçük moleküllerin mitokondri yüzeyinden içeri ve dışarı taşınması için gerekli olan enerji oksidatif forforilasyon sırasında iç mitokondriyel membran üzerinden gerçekleşen proton pompalaması tarafından oluşturulan elektrokimyasal gradiyent ile sağlanır (bkz. Şekil 3.6 ve 3.7).



Şekil 12.9 Fosfolipid transfer proteinleri Fosfolipid transfer proteinleri ER zarından fosfolipid moleküllerini çıkartır ve onları mitokondri dış zarına taşır.



Şekil 12.10 Metabolitlerin mitokondri iç zarından taşınımı Küçük moleküllerin iç zardan taşınımı zarı kat eden proteinler aracılığıyla ve elektrokimyasal gradient sayesinde gerçekleşir. Örneğin, ATP mitokondriden sitozole, onu ADP ile değiştiren bir taşıyıcı tarafından gönderilir. Elektrokimyasal gradientin voltaj bileşeni bu karşılıklı değişimi sağlar: ATP (-4) ADP'den (-3) daha fazla negatif yük taşır, bu nedenle ADP mitokondri içine alınırken ATP mitokondri matriksinden sitozole gönderilir. Buna karşılık, fosfatın (P_i) ve pirüvatın taşınmaları hidroksil iyonları (OH^-) ile değiştirilerek gerçekleşir; bu durumda, elektrokimyasal gradiyentin pH bileşeni P_i ve pirüvatın mitokondriye taşınmasına eşlenen hidroksil iyonlarının uzaklaştırılmasını sağlar.

Bölüm 3'de tartışıldığı gibi, iç mitokondri zarı üzerindeki proton gradienti hem kimyasal hem de elektriksel komponentler içermekte olup, her iki komponent de metabolitlerin taşınmasını kontrol eder (Şekil 12.10). Örneğin, iç zar üzerinden ATP ve ADP'nin taşınması integral zar proteini olan adenin nükleotid taşıyıcısı aracılığı ile gerçekleşir. Bu protein, mitokondriye bir molekül ADP taşırken karşılığında mitokondriden sitozole de bir molekül ATP transfer eder. ATP, ADP'den daha fazla negatif yük (-4'e karşılık -3) taşıdığından, bu değişim işlemi voltaj komponentinin elektrokimyasal gradienti ile gerçekleşir. Proton gradienti zarın sitozolik tarafında pozitif yük oluşturduğundan ADP karşılığında ATP'nin dışarı gönderilmesi enerjetik olarak tercih edilen bir durumdur.

Mitokondri içinde ATP sentezi, ADP'nin yanı sıra fosfat iyonları (P_i) da gerektirdiğinden P_i'nin de sitozolden mitokondriye taşınması gerekmektedir. Bu işlem, mitokondriden içeri fosfat ($H_2PO_4^-$) alan ve karşılığında hidroksil (OH^-) iyonlarını dışarıya gönderen bir başka membran taşıma proteini tarafından gerçekleşir. Bu moleküler değiş tokuş, fosfat ve hidroksil iyonları -1 yüklü olduğundan elektriksel olarak nötrdür. Ancak değiş tokuş proton konsantrasyon gradiyenti sayesinde gerçekleşir. Mitokondrinin içinde daha yüksek pH olması, daha yüksek konsantrasyondaki hidroksil iyon varlığı ile eşleşir ve zarın sitozolik tarafına translokasyonlarını destekler.

Elektrokimyasal gradientten gelen enerji, benzer şekilde diğer metabolitlerin mitokondriye taşınmasının sağlanmasında kullanılır. Örneğin, glikolizis ile üretilen pirüvatın sitozolden mitokondri içine alınması, pirüvatı hidroksil iyonları ile değiştiren bir taşıma proteini sayesinde gerçekleşir. Sitrik asit döngüsünün diğer aracıları benzer değişim mekanizmaları ile mitokondri ve sitozol arasında gidip gelirler.

Kloroplastlar ve Diğer Plastidler

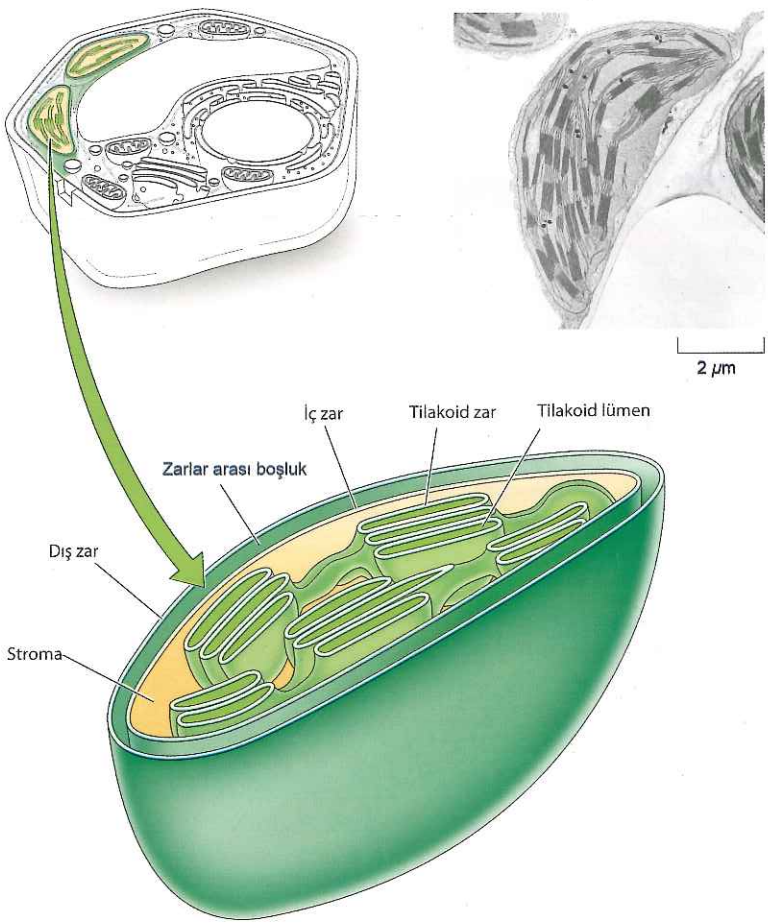
Fotosentezden sorumlu organeller olan **kloroplastlar**, birçok yönüyle mitokondrilere benzerdir. Kloroplastlar ve mitokondriler her ikisi de, metabolik

enerji üretirler, evrim sürecinde endosimbiyoz sonucu oluşmuşlardır, kendi genetik sistemlerine sahiptirler ve bölünerek çoğalırlar. Ancak, kloroplastlar mitokondrilerden daha büyük ve daha karmaşıktır ve ATP üretimine ek olarak bazı önemli görevleri yerine getirirler. En önemlisi, kloroplastlar, CO_2'in fotosentez yoluyla karbohidratlara dönüştürülmesinden sorumludur. Kloroplastlar ayrıca, amino asitleri, yağ asitlerini ve kendi zarlarının lipid bileşenlerini de sentezlerler. Azotun organik bileşiklerin yapısına girmesi için ana yol olan, nitritin (NO_2^-) amonyağa (NH_3) indirgenmesi de kloroplastlarda gerçekleşir. Üstelik kloroplastlar, bitki hücrelerinde çeşitli görevler üstlenmiş birkaç tip ilişkili organelden (plastidler) sadece biridir.

Kloroplastların yapı ve işlevi

Bitki kloroplastları, mitokondriler gibi, kloroplast zarfı adı verilen çift zarla kaplanmış, büyük (5 ile 10 μm uzunluk) organellerdir (**Şekil 12.11**). Kloroplastlar, zarfın iç ve dış zarlarına ek olarak tilakoid zar adı verilen üçüncü bir iç zara sahiptirler. **Tilakoid zar**, tilakoid adı verilen yassı diskler oluşturur ki bunlar da grana denilen yığınlar şeklinde düzenlenirler. Bu üç zar yapısı nedeniyle kloroplastların iç düzeni mitokondrininkinden daha karmaşıktır.

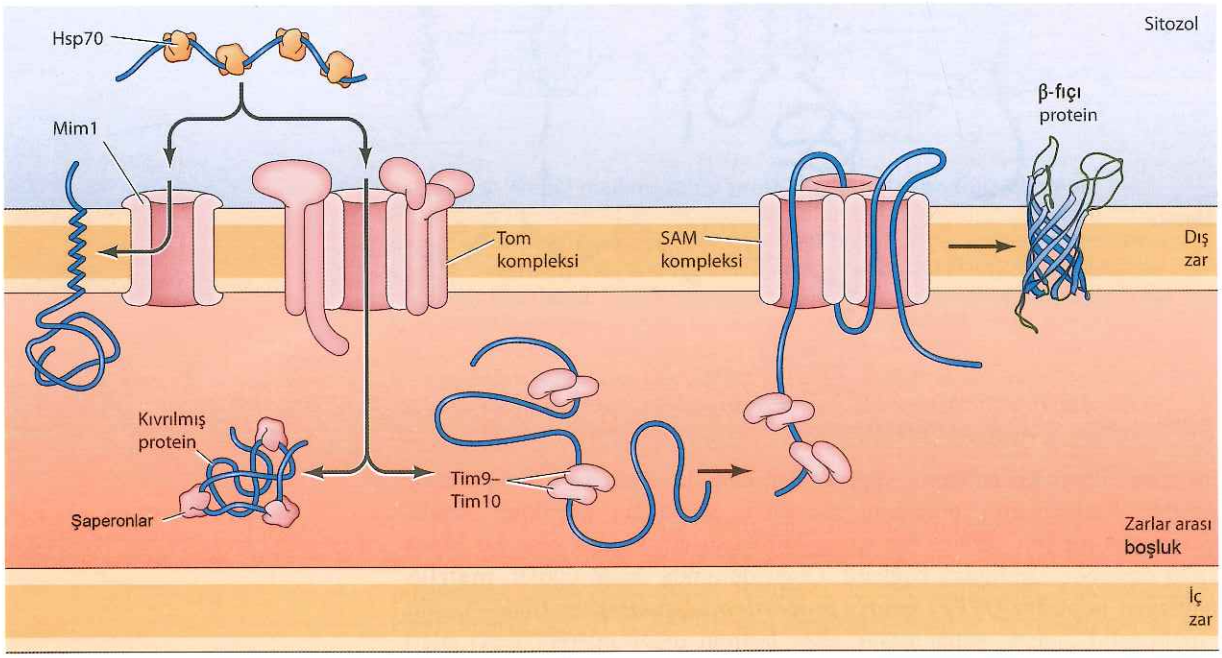
Video 12.3
sites.sinauer.com/cooper7e/v12.3
***Elodea*'da Kloroplastlar**
Kloroplastlar, CO_2'nin karbohidratlara fotosentetik dönüşümünden sorumludur.



Şekil 12.11 Kloroplast yapısı
Zarfın iç ve dış zarlarına ek olarak kloroplast, tilakoid zar olarak tanımlanan üçüncü bir iç zar sistemine sahiptir. Bu zarlar kloroplastı zarlar arası boşluk, stroma ve tilakoid lümen olmak üzere üç farklı iç bölüme ayırır.

tarafından tanınırlar. Sonrasında, Tim9-Tim10 şaperonları bu proteinlere iç zarın ikinci translokazına (Tim22) kadar eşlik eder. Bu proteinler daha sonra, iç transmembran diziler ile Tim22 porundan yatay olarak çıkarılmadan ve iç zara eklenmeden önce, Tim22 sayesinde kısmen yer değiştirirler. Mitokondrilerin içine gönderilen iç zar proteinlerine ek olarak, bazı iç zar proteinleri mitokondri genomu tarafından kodlanır (bkz. Şekil 12.4). Bu proteinler, mitokondri matriksi içerisindeki ribozomlar üzerinde sentezlenir ve iç zarda bulunan bakteri membranı insersiyon sistemi ile ilişkili Oxa1 translokaza yönlendirilir. Proteinler sonrasında matriksin dışından zarlar arası boşluğa doğru yer değiştirir ve iç zara eklenmek üzere Oxa1'i yatay olarak terk ederler.

Dış zar ya da zarlar arası boşluğa gidecek olan proteinler de Tom kompleksi ile içeri alınırlar (**Şekil 12.7**). Birçok dış zar proteini (örneğin porinler) Tom kompleksi üzerinden zarlar arası boşluğa geçen β-fıçı proteinleridir (bkz. Şekil 2.35). Bu proteinler daha sonra, gezici Tim9-Tim10 şaperonları tarafından tanınır ve dış zara eklenmelerine aracılık eden SAM (tasnif ve yapılanma düzeneği = *sorting and assembly machinery*) kompleksi adındaki ikinci bir translokon kompleksine taşınırlar. Buna ek olarak, α-sarmal transmembran bölgelerine sahip bazı dış zar proteinleri, Mim1 dış zar proteini aracılığıyla farklı bir yolak üzerinden zara dahil olurlar. Proteinler, Tom kompleksinden çıktıktan sonra belirli şaperonlar tarafından tanınan sisteince zengin diziler aracılığla zarlar arası boşluğa yönlendirilir.

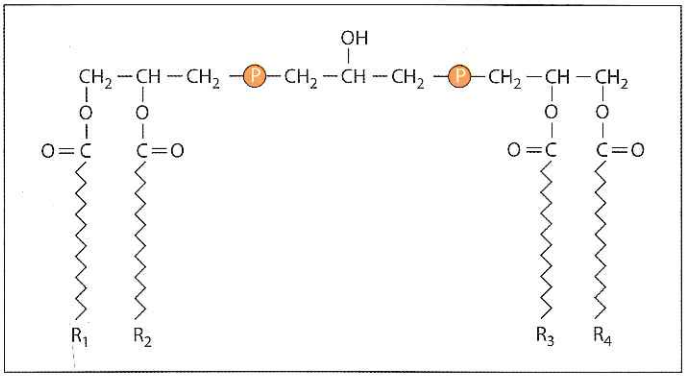


Şekil 12.7 Proteinlerin dış zara ve zarlar arası boşluğa yönlendirilmesi Dış zara gidecek olan tek transmembran bölgeye sahip proteinler, Mim1 dış zar proteini üzerine yerleştirilir. Dış zardaki β-fıçı protein öncüleri, Tom kompleksi üzerinden aktarılır ve zarlar arası boşluktaki Tim9-Tim10 şaperon proteinleri aracılığı ile bağlanırlar. Sonrasında, SAM (tasnif ve yapılandırma düzeneği: *sorting and assembly machinery*) adındaki ikinci translokon kompleksine yönlendirilir ve dış zar içine yerleştirilirler. Zarlar arası boşluğa gidecek olan proteinler Tom kompleksi aracılığı ile transloke edilir ve zarlar arası alandaki belirli şaperonlar tarafından tanınırlar.

Mitokondri lipidleri

Sadece proteinler değil mitokondri zarlarındaki lipidlerin çoğu da sitozolden getirilir. Hayvan hücrelerinde, sfingolipidler, kolesterol, fosfatidilkolin, fosfatidilinozitol ve fosfotidilserin ER'de sentezlenir ve mitokondriye taşınırlar. Mitokondri daha sonra fosfatidilserinden fosfatidiletanolamin sentezler. Mitokondri ayrıca dört yağ asidi zinciri içeren ve nadir bir fosfolipid olan **kardiyolipinin** sentezini de katalizler (**Şekil 12.8**). Kardiyolipin, zar boyunca proton akışını bir miktar kısıtlayarak oksidatif fosforilasyonun etkinliğini arttırmak üzere mitokondrinin iç zarında yerleşiktir.

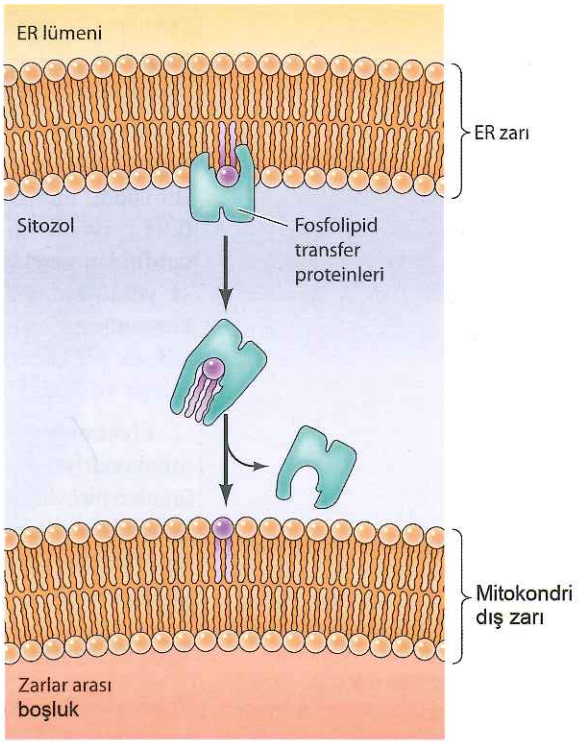
ER ve mitokondri arasında lipidlerin geçişi, her iki hücresel yapının birbiri ile yakın etkileşimde olduğu bölgelerde gerçekleşir. Bu geçişin ER membranından fosfolipid moleküllerini seçip çıkaran eden **fosfolipid transfer proteinleri** üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir (**Şekil 12.9**). Sonrasında lipidler proteinin hidrofobik bağlanma bölgesine gömülü halde sitozoldeki aköz ortamdan geçip mitokondri zarına ulaştığında serbest kalır. Lipidler, mitokondrinin dış ve iç zarları arasında,bu zarların birbirleri ile temasta olduğu noktalardan değiş tokuş edilirler.



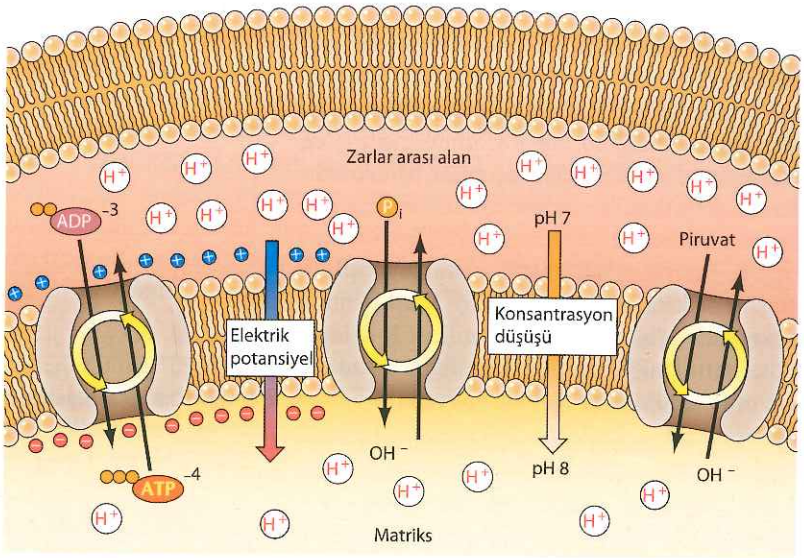
Şekil 12.8 Kardiyolipinin yapısı Dört yağ asidi zinciri içeren nadir "ikili" bir fosfolipid olan kardiyolipin öncelikle iç mitokondri zarında bulunur.

Metabolitlerin iç membran boyunca taşınması

Mitokondrinin metabolik enerji oluşturmadaki fonksiyonunun gerçekleşebilmesi için küçük moleküllerin mitokondrinin içine ve dışına doğru etkin şekilde taşınması gerekmektedir. Örneğin, mitokondrinin içinde sentezlenen ATP'nin sitozole taşınması ve ATP sentezinin sürekliliği için ADP ve P_i'nin sitozolden içeriye alınması gereklidir. Mitokondrinin dış zarı küçük moleküllere serbest şekilde geçirgendir. Ancak iç zardaki proteinlerin çoğu küçük molekül taşıyıcılarıdır (bkz. Şekil 12.6). Küçük moleküllerin mitokondri yüzeyinden içeri ve dışarı taşınması için gerekli olan enerji oksidatif forforilasyon sırasında iç mitokondriyel membran üzerinden gerçekleşen proton pompalaması tarafından oluşturulan elektrokimyasal gradiyent ile sağlanır (bkz. Şekil 3.6 ve 3.7).



Şekil 12.9 Fosfolipid transfer proteinleri Fosfolipid transfer proteinleri ER zarından fosfolipid moleküllerini çıkartır ve onları mitokondri dış zarına taşır.



Şekil 12.10 Metabolitlerin mitokondri iç zarından taşınımı Küçük moleküllerin iç zardan taşınımı zarı kat eden proteinler aracılığıyla ve elektrokimyasal gradient sayesinde gerçekleşir. Örneğin, ATP mitokondriden sitozole, onu ADP ile değiştiren bir taşıyıcı tarafından gönderilir. Elektrokimyasal gradientin voltaj bileşeni bu karşılıklı değişimi sağlar: ATP (-4) ADP'den (-3) daha fazla negatif yük taşır, bu nedenle ADP mitokondri içine alınırken ATP mitokondri matriksinden sitozole gönderilir. Buna karşılık, fosfatın (P_i) ve pirüvatın taşınmaları hidroksil iyonları (OH^-) ile değiştirilerek gerçekleşir; bu durumda, elektrokimyasal gradiyentin pH bileşeni P_i ve pirüvatın mitokondriye taşınmasına eşlenen hidroksil iyonlarının uzaklaştırılmasını sağlar.

Bölüm 3'de tartışıldığı gibi, iç mitokondri zarı üzerindeki proton gradienti hem kimyasal hem de elektriksel komponentler içermekte olup, her iki komponent de metabolitlerin taşınmasını kontrol eder (**Şekil 12.10**). Örneğin, iç zar üzerinden ATP ve ADP'nin taşınması integral zar proteini olan adenin nükleotid taşıyıcısı aracılığı ile gerçekleşir. Bu protein, mitokondriye bir molekül ADP taşırken karşılığında mitokondriden sitozole de bir molekül ATP transfer eder. ATP, ADP'den daha fazla negatif yük (-4'e karşılık -3) taşıdığından, bu değişim işlemi voltaj komponentinin elektrokimyasal gradienti ile gerçekleşir. Proton gradienti zarın sitozolik tarafında pozitif yük oluşturduğundan ADP karşılığında ATP'nin dışarı gönderilmesi enerjetik olarak tercih edilen bir durumdur.

Mitokondri içinde ATP sentezi, ADP'nin yanı sıra fosfat iyonları (P_i) da gerektirdiğinden P_i'nin de sitozolden mitokondriye taşınması gerekmektedir. Bu işlem, mitokondriden içeri fosfat ($H_2PO_4^-$) alan ve karşılığında hidroksil (OH^-) iyonlarını dışarıya gönderen bir başka membran taşıma proteini tarafından gerçekleşir. Bu moleküler değiş tokuş, fosfat ve hidroksil iyonları -1 yüklü olduğundan elektriksel olarak nötrdür. Ancak değiş tokuş proton konsantrasyon gradiyenti sayesinde gerçekleşir. Mitokondrinin içinde daha yüksek pH olması, daha yüksek konsantrasyondaki hidroksil iyon varlığı ile eşleşir ve zarın sitozolik tarafına translokasyonlarını destekler.

Elektrokimyasal gradientten gelen enerji, benzer şekilde diğer metabolitlerin mitokondriye taşınmasının sağlanmasında kullanılır. Örneğin, glikolizis ile üretilen pirüvatın sitozolden mitokondri içine alınması, pirüvatı hidroksil iyonları ile değiştiren bir taşıma proteini sayesinde gerçekleşir. Sitrik asit döngüsünün diğer aracıları benzer değişim mekanizmaları ile mitokondri ve sitozol arasında gidip gelirler.

Kloroplastlar ve Diğer Plastidler

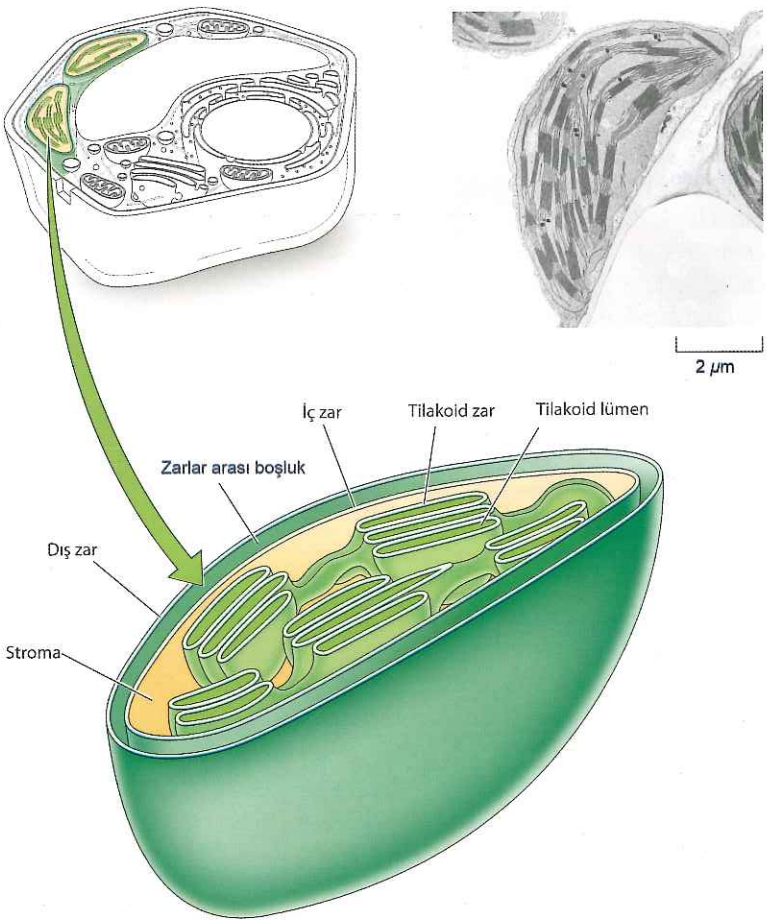
Fotosentezden sorumlu organeller olan **kloroplastlar**, birçok yönüyle mitokondrilere benzerdir. Kloroplastlar ve mitokondriler her ikisi de, metabolik

enerji üretirler, evrim sürecinde endosimbiyoz sonucu oluşmuşlardır, kendi genetik sistemlerine sahiptirler ve bölünerek çoğalırlar. Ancak, kloroplastlar mitokondrilerden daha büyük ve daha karmaşıktır ve ATP üretimine ek olarak bazı önemli görevleri yerine getirirler. En önemlisi, kloroplastlar, CO_2'in fotosentez yoluyla karbohidratlara dönüştürülmesinden sorumludur. Kloroplastlar ayrıca, amino asitleri, yağ asitlerini ve kendi zarlarının lipid bileşenlerini de sentezlerler. Azotun organik bileşiklerin yapısına girmesi için ana yol olan, nitritin (NO_2^-) amonyağa (NH_3) indirgenmesi de kloroplastlarda gerçekleşir. Üstelik kloroplastlar, bitki hücrelerinde çeşitli görevler üstlenmiş birkaç tip ilişkili organelden (plastidler) sadece biridir.

Kloroplastların yapı ve işlevi

Bitki kloroplastları, mitokondriler gibi, kloroplast zarfı adı verilen çift zarla kaplanmış, büyük (5 ile 10 μm uzunluk) organellerdir (**Şekil 12.11**). Kloroplastlar, zarfın iç ve dış zarlarına ek olarak tilakoid zar adı verilen üçüncü bir iç zara sahiptirler. **Tilakoid zar**, tilakoid adı verilen yassı diskler oluşturur ki bunlar da grana denilen yığınlar şeklinde düzenlenirler. Bu üç zar yapısı nedeniyle kloroplastların iç düzeni mitokondrininkinden daha karmaşıktır.

Video 12.3
sites.sinauer.com/cooper7e/v12.3
***Elodea*'da Kloroplastlar**
Kloroplastlar, CO_2'nin karbohidratlara fotosentetik dönüşümünden sorumludur.

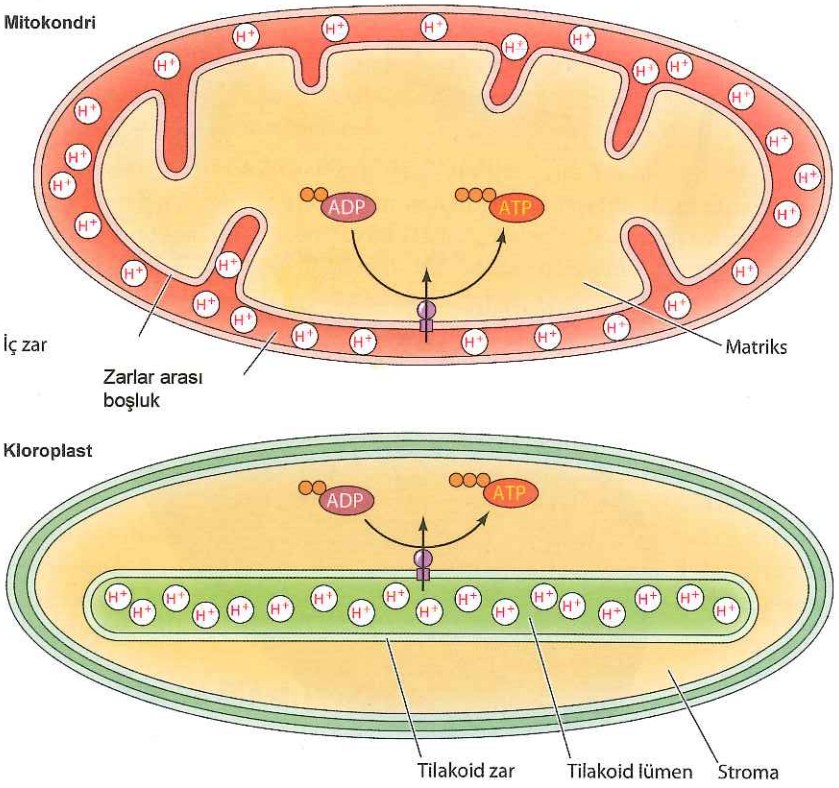


Şekil 12.11 Kloroplast yapısı
Zarfın iç ve dış zarlarına ek olarak kloroplast, tilakoid zar olarak tanımlanan üçüncü bir iç zar sistemine sahiptir. Bu zarlar kloroplastı zarlar arası boşluk, stroma ve tilakoid lümen olmak üzere üç farklı iç bölüme ayırır.

Özellikle, üç zar kloroplastı üç farklı bölmeye ayırır; (1) kloroplast zarfının iki zarı arasındaki zarlar arası boşluk, (2) zarfın içinde ancak tilakoid zarın dışında kalan **stroma** ve (3) tilakoid lümen.

Daha karmaşık olmasına karşın kloroplast zarları, beklendiği gibi, mitokondrilerin zarları ile, her iki organelin de ATP'nin üretimindeki rollerine uygun, açık bir işlevsel benzerliğe sahiptir. Kloroplast zarfının dış zarı, mitokondrideki gibi, porinler içerdiği için küçük moleküllerin serbest geçişine izin verir. Buna karşılık iç zar, iyonları ve metabolitleri geçirmez. Bu nedenle bu moleküller kloroplasta ancak zardaki özgün taşıyıcılar aracılığıyla girebilirler. Kloroplast zarfının iç ve dış zarlarının bu özellikleri mitokondrinin iç ve dış zarlarına benzer: Her iki durumda da iç zar, organelin içi ile sitozol arasında moleküllerin geçişini sınırlar. Kloroplast stroması da işlevsel açıdan mitokondri matriksine eşdeğerdir: kloroplast genetik sistemini ve ki bunlara, fotosentez sırasında CO_2'in karbohidratlara dönüştürülmesinden sorumlu olan çeşitli metabolik enzimleri içerir.

Yapı ve işlev bakımından kloroplastlar ile mitokondriler arasındaki en büyük fark tilakoid zardır. Kloroplastın bu zarı temel öneme sahiptir, elektron taşınmasında ve ATP'nin üretiminde mitokondri iç zarının görevini üstlenir (Şekil 12.12). Kloroplast zarfının iç zarı (katlanarak krista oluşturmaz) fotosentezde görev almaz. Bunun yerine, kloroplast elektron taşıma sistemi tilakoid zarda yerleşiktir ve protonlar bu zarın bir yanından diğer yanın, stromadan tilakoid lümenin içine pompalanırlar. Oluşan elektrokimyasal



Şekil 12.12 Kloroplast ve mitokondrilerde kemiozmotik ATP üretimi Mitokondrilerde elektron taşınımı iç zarın iki yanında bir proton gradienti oluşturur ki bu da, ATP sentezinin matrikste yürütülmesi için kullanılır. Kloroplastlarda proton gradienti tilakoid zarın iki yanında oluşur ve ATP sentezinin stromada yürütülmesi için kullanılır.

gradient, protonların stromaya geri dönüşü sırasında ATP sentezini gerçekleştirir. Metabolik enerji oluşumundaki rolü açısından kloroplast tilakoid zarı mitokondri iç zarına denktir.

Kloroplast genomu

Mitokondriler gibi kloroplastlar da, evrimde fotosentetik bakterilerden köken aldıklarının göstergesi olarak kendi genetik sistemlerine sahiptirler. Kloroplast genomları, her organelde çoklu kopyalar şeklinde dairesel DNA'ların bulunması açısından mitokondri genomlarına benzerlik gösterir. Ancak, kloroplast genomu mitokondri genomundan daha büyük ve daha karmaşık olup 100-200 kb arasındadır ve yaklaşık 150 gen içerir.

Farklı türlerin kloroplast genomları arasında her ne kadar belirgin değişkenlik bulunsa da, genellikle ortak bir grup gen içerirler. Bu genler, gen ekspresyonunda görevli RNA ve proteinleri kodladıkları gibi, fotosentezde işlev gören çeşitli proteinleri de kodlar (**Tablo 12.2**). Kloroplast mRNA'larının translasyonunda kullanılan ribozomal ve taşıyıcı RNA'lar organel genomu tarafından kodlanır. Bunlar bakteri rRNA'larına benzer şekilde üç rRNA (23S, 16S ve 5S) ve 27-31 tRNA içerir. Mitokondri genomunun kodladığı daha az sayıdaki tRNA'ya karşın, kloroplast tRNA'ları tüm mRNA kodonlarını evrensel genetik koda göre okumak için yeterlidir. Kloroplast genomu, translasyon sistemindeki RNA bileşenlerinin yanı sıra, kloroplast ribozom proteinlerinin çoğunu temsil eden, 40 kadar ribozomal protein kodlar.RNA polimerazın dört alt biriminin en az üçü kloroplastlarda kodlanıyor ise de, RNA polimerazın diğer alt birimleri ve kloroplast gen ekspresyonu için gerekli diğer faktörler nükleusda kodlanır.

Kloroplast genomu, fotosentezde görev alan 50 kadar protein de kodlar. Bunlar arasında fotosistem I ve II, sitokrom *bf* kompleksi, ATP sentazın bileşenleri ve NADP redüktaz dehidrogenazın komponentleri bulunmaktadır (bkz. Şekil 3.13). Kloroplast genomundaki diğer ilave genler metabolizma, protein katlanması ve membran yerleşimi ile ilişkili proteinleri kodlar. Ayrıca, ribüloz bisfosfat karboksilaz'ın (*rubisco*) alt birimlerinden birisi de kloroplast DNA'sı tarafından kodlanır. *Rubisco*, Calvin döngüsünde CO_2'nin ribüloz-1,5-bisfosfat'a bağlanmasını katalizleyen önemli bir enzimdir (bkz. Şekil 3.15). Bu proteinin sadece kloroplast stromasının temel bileşeni değil, aynı zamanda yeryüzünde en fazla bulunan protein olduğu düşünülmektedir.

Tablo 12.2 Kloroplast DNA'sı ile Kodlanan Genler

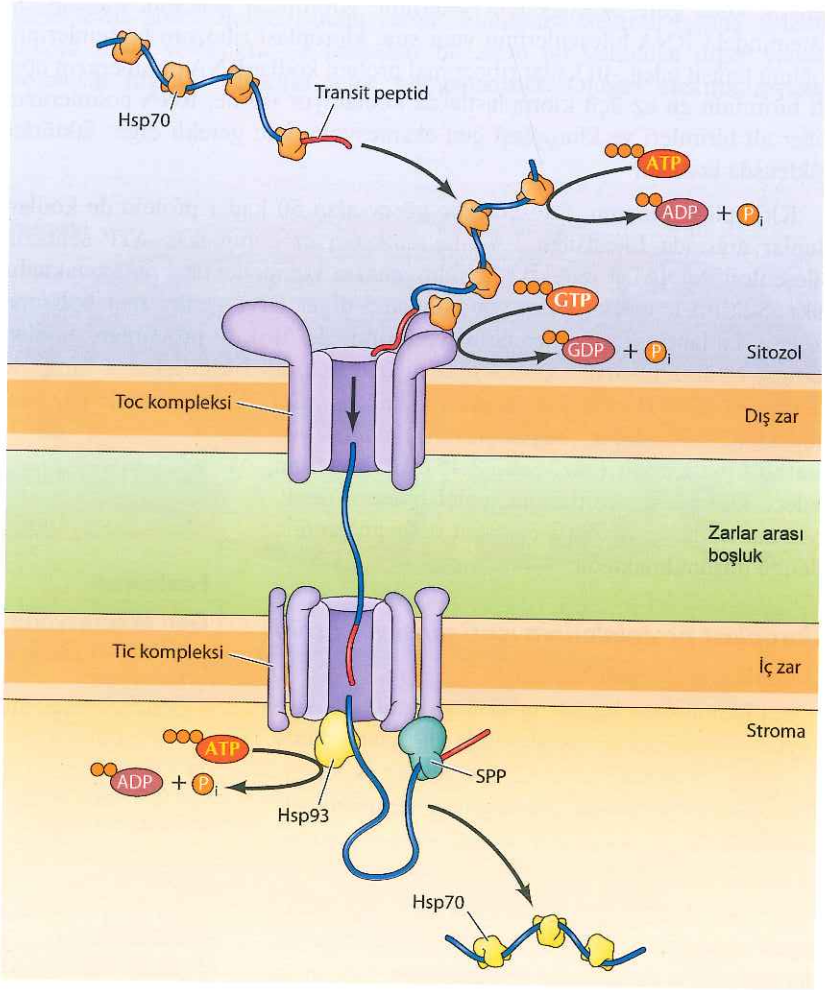
Fonksiyon	Gen sayısı
Gen ekspresyonu	
rRNA'lar (23S, 16S, 5S)	3
tRNA'lar	30
Ribozomal proteinler	40
RNA polimeraz altbirimleri	4
Fotosentez	
Fotosistem I	8
Fotosistem II	18
Sitokrom bf kompleksi	8
ATP sentaz	8
NADP redüktaz dehidrogenaz	11
Metabolizma	11
Protein katlanması ve membrana yerleşme	14

Kloroplast proteinlerinin içeri girişi ve tasnifi

Kloroplastlar mitokondrilere göre, kendi proteinlerinin daha büyük bir kısmını kodlamalarına karşın, kloroplast proteinlerinin yaklaşık 3000'i ya da %95'i hala nükleer genlerden kodlanır. Mitokondrilerde olduğu gibi, bu proteinler sitozoldeki ribozomlarda sentezlenirler ve kloroplast içerisine tamamlanmış polipeptid zincirleri olarak alınırlar. Daha sonra bunlar, kloroplastların içerisinde uygun yerleşim bölgelerine dağıtılırlar. Bu iş, kloroplastların üç ayrı zar sistemlerinin bulunması

ve bunların üç ayrı iç bölme oluşturmaları nedeniyle mitokondrilerdeki protein dağıtımından çok daha zordur.

Proteinlerin çoğu, kloroplastların içine alınmak üzere, N- ucunda bulunan, genellikle 30 ile 100 amino asitten oluşan, **transit peptidleri** denilen ve proteinlerin kloroplast zarfının iki zarından geçmelerini sağladıktan sonra proteolitik kesimle uzaklaştırılan dizinlerle hedeflenirler (Şekil 12.13) Transit peptitleri proteinleri kloroplast dış zarındaki translokaza **(Toc kompleksine)** yönlendirir. Mitokondri protein alımındaki öncül dizilerden farklı olarak, transit peptidler pozitif yüklü değildir ve kloroplast iç zarı güçlü bir elektrik potansiyel taşımaz. Kloroplastlara protein alımında proteini katlanmamış durumda korumak için, Hsp70 molekülleri gerekir. Diğer Hsp70 molekülleri aynı zamanda Toc kompleksine bağlanarak, ATP hidroliziyle proteinin içeriye alınmasını sağlarlar. Ek olarak, bazı Toc proteinleri GTP'ye bağlanır ve onu hidrolize ederek translokasyon için ek enerji kaynağı sağlar. Öncü proteinler Toc kompleksi üzerinden taşındıktan sonra, kloroplastın iç zarındaki translokaza **(Tic kompleksi)** transfer edilir ve stromaya taşınır. Tic

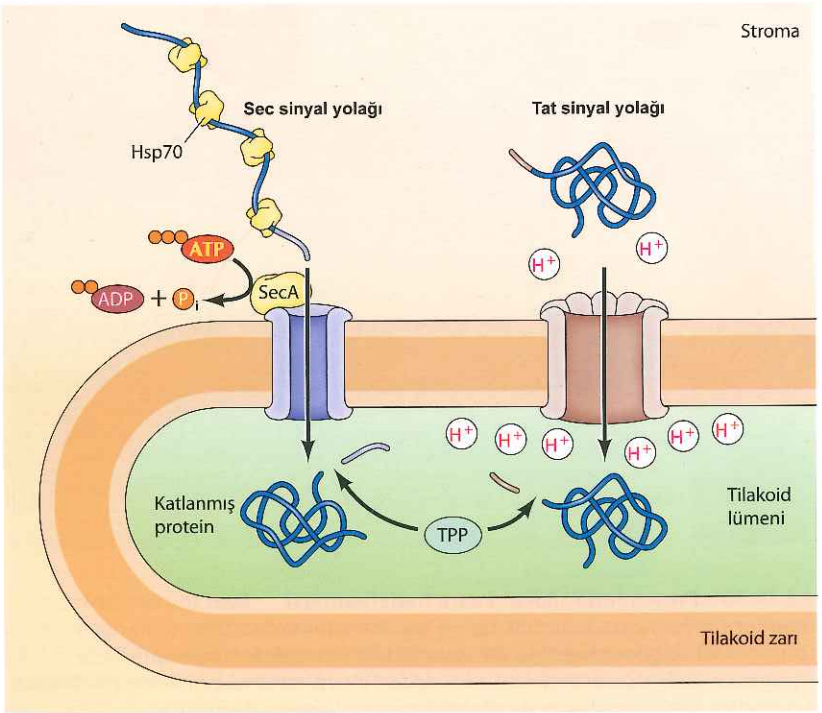


Şekil 12.13 Proteinlerin kloroplast stromasına alınması (import) N-ucu transit peptidleri olan proteinler, kloroplast dış zarındaki Toc kompleksine yönlendirilirler. Dış zardan geçme işlemi için Hsp70 tarafından ATP'nin ve Toc proteinleri tarafından GTP'nin hidrolizine gerek duyulur. Kloroplast dış zarından çıktıktan sonra, transit peptid iç zardaki Tic kompleksine aktarılır. Öncül protein Tic kompleksine Hsp93 şaperonu tarafından çekilir. Transit peptid stromada, kloroplast stromal işlemleyici peptidaz (*stromal processing peptidaz:* SPP) tarafından uzaklaştırılır.

kompleksinin stromal tarafı ile ilişkili olan kloroplast Hsp93 şaperonu, öncü proteini iç zara çeker. Stromada, bir transit peptit olan **stromal işlemleyici peptidaz (*SPP:stromal processing peptidase*)** tarafından kesilir ve protein stromal Hsp70 şaperonu ile birleşir.

Kloroplast zarfındaki zarların içerisine proteinlerin katılmasında rol oynayan yolaklar tam olarak bilinmemektedir. Dış zar proteinleri transit peptidlere sahip değildir ve zara doğrudan hedeflenirler. Burada Toc kanalının bu birleşmeyi gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Bazı iç zar proteinleri Toc kompleksi ile içeri alınır ve Tic kanalından lateral olarak çıkmalarını sağlayan transmembran bölgeler ile iç zara hedeflenirler. Diğer iç zar proteinleri, mitokondrinin bazı iç zar proteinlerine benzer şekilde önce stromaya alınır, daha sonra iç zara yeniden yönlendirilirler (bkz. Şekil 12.26). Ancak bu yolağa aracılık eden kloroplast mekanizması henüz tanımlanmamıştır.

Tilakoid lümene hedeflenen proteinler iki aşamada taşınırlar. Yukarıda tanımlandığı üzere önce stroma içine alınır ve daha sonra transit peptidin kesilmesi sonrasında ortaya çıkan ikinci bir sinyal dizi ile tilakoid zar üzerinde yer değiştirmek üzere hedeflenir. Proteinlerin stromadan tilakoid lümene alınımında iki farklı yolak etki eder (**Şekil 12.14**). Sec yolağı, bakteri tarafından protein salınımı için kullanılan bir yolaktan evrimleşmiştir ve proteinlerin endoplazmik retikulumda yer değiştirmesi için kullanılan bir yolak ile ilişkilidir (Bölüm 11'de tartışılmıştır). Bu yolakta, tilakoid sinyal dizisi SecA proteini ile tanınır ve ATP'ye bağımlı şekilde Sec translokonu üzerinde katlanmamış protein olarak yer değişitirir. Kloroplastlar tarafından kullanılan ikinci yolak olan ikiz arjinin yer değiştirme (Tat: *twin-arginine translocation*) yolağı da bakteri zarı yer değiştirme sistemi ile ilişkilidir.



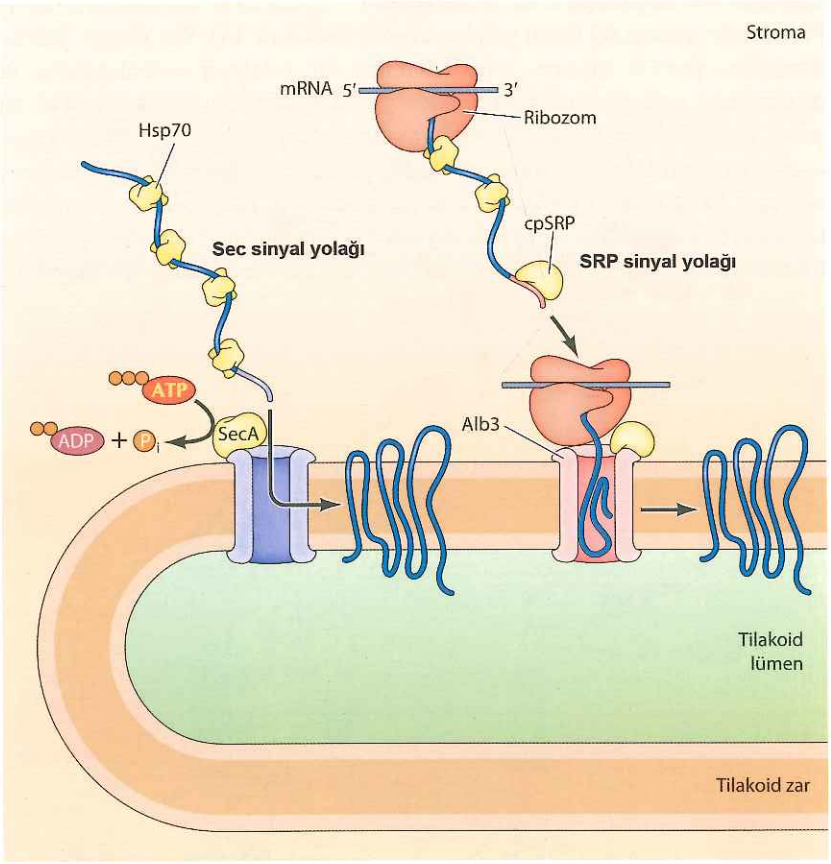
Şekil 12.14 Proteinlerin tilakoid lümene alınması Proteinlerin stromadan tilakoid lümene aktarılması 2 yolak üzerinden gerçekleşir. Sec yolağında, SecA proteini tilakoid sinyal dizisini tanır ve ATP'nin hidrolizinden gelen enerjiyi kullanarak proteini lümene göndermek için Sec translokona yönlendirir. İkiz-arjinin translokasyon (Tat) yolağında, amino ucunun yanındaki iki arjinine sahip kesilebilir tilakoid transfer dizisi, tamamen katlanmış proteinleri Tat translokonuna yönlendirir. Bu translokon tilakoid zardaki proton gradiyentinden gelen enerjiyi kullanarak onları tilakoid lümene aktarır. Lümen içerisinde tilakoid sinyal dizileri tilakoid işlemleyici proteaz (TPP) tarafından kesilir.

Bilgi İçin

Proteinleri endoplazmik retikuluma hedefleyen sinyal tanıma partikülünün (SRP) aksine kloroplast SRP (cpSRP) RNA elemanı içermez. (bkz. Bölüm 11)

Bu yolakta proteinler, ikiz arjinin sinyal dizisi ile tanınır ve tilakoid zar üzerinden tam katlanmış olarak taşınırlar. Tat yolağında taşınma için gerekli olan enerji, tilakoid zar üzerindeki proton gradiyenti ile sağlanır. Her iki yolakta, tilakoid sinyal dizileri tilakoid lümen içerisinde tilakoid işlemleyici proteaz (TPP) tarafından kesilir.

Proteinler, tilakoid zara en az üç yolak üzerinden hedeflenir (**Şekil 12.15**). İlkinde, transmembran diziye sahip bazı proteinler Sec translokondan yanal olarak çıkabilir. Alternatif olarak bazı proteinler, tilakoid zara mitokondri iç zarına ait olan Oxa1 ile ilişkli olan Alb3 insersiyon düzeneği ile dahil olur (bkz. Şekil 12.6). Bu proteinler, kloroplast genomu tarafından kodlanan ve translasyonu stromadaki ribozomlar tarafından gerçekleşen tilakoid zar proteinlerini hedefleyebilen kloroplast sinyal tanıma partikülü (cpSRP) ile ALB3'e hedeflenirler. Son olarak, birçok tilakoid zar proteinlerinin yerleştirilmesi Sec ya da SRP yolaklarından bağımsızdır ve bilinen herhangi bir taşıma sistemini içermeyen "doğal" bir mekanizma ile gerçekleşebilir.



Şekil 12.15 Proteinlerin tilakoid zara hedeflenmesi Bazı transmembran proteinler tilakoid zara katılmak üzere Sec translokazdan lateral olarak ayrılır. Stromanın içine gönderilen ya da stromadaki kloroplast ribozomlarında sentezlenen diğer zar proteinleri, kloroplast sinyal tanıma partikülü tarafından tanınırlar ve Alb3 translokaz ile tilakoid zar içerisine yerleştirilirler.

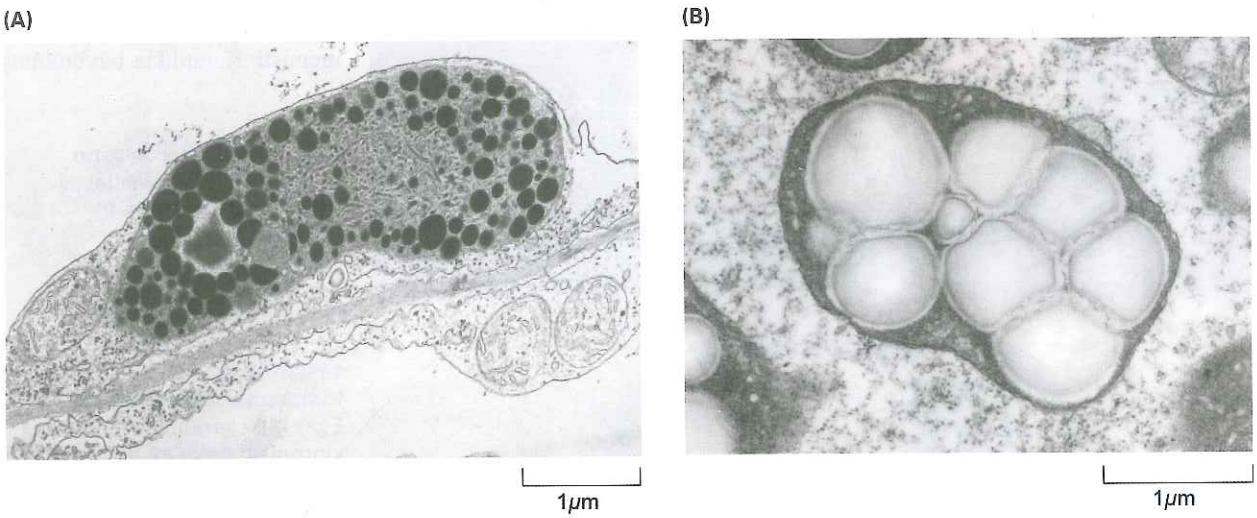
Diğer plastidler

En tanınmışı olsa da, kloroplastlar **plastidler** adı verilen, büyük bir bitki oganelleri ailesinin yalnızca bir üyesidir. Tüm plastidler kloroplastlarla aynı genoma sahiptirler, ancak, yapı ve işlev yönleriyle farklılık gösterirler. Kloroplastlar fotosentez için özelleşmişlerdir ve iç tilakoid zar sistemine sahip olmalarıyla ayrıcalıklıdırlar. Bitki hücresi metabolizmasının farklı yönlerinde görev alan diğer plastidler (amino asit, yağ asitleri ve lipidler, bitki hormonları, nükleotidler, vitaminler ve ikincil metabolitlerin sentezi gibi) plastid zarfının iki zarıyla çevrilmişlerdir ancak, tilakoid zarlara ve fotosentez aygıtının diğer bileşenlerine sahip değillerdir.

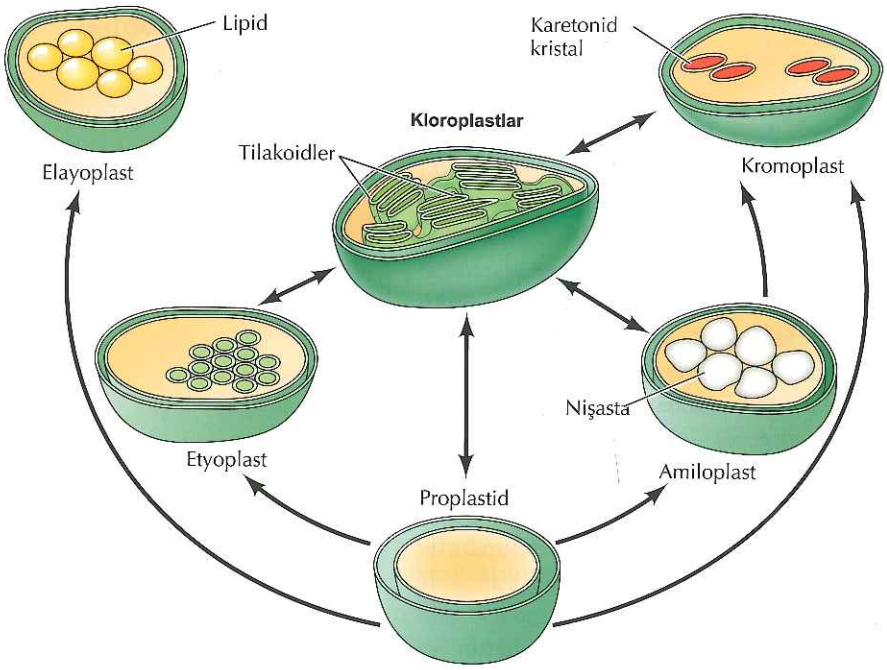
Farklı plastid tipleri genellikle içerdikleri pigmentlerin çeşidine göre sınıflandırılırlar. Kloroplastlar klorofil içerdikleri için böyle adlandırılmışlardır. **Kromoplastlar** (Şekil 12.16A) klorofilden yoksundurlar fakat karotenoidler içerirler, bazı çiçeklerin ve meyvelerin sarı, turuncu ve kırmızı renklerinin nedenidirler ancak, hücre metabolizmasındaki esas görevleri açık değildir. **Lökoplastlar** pigment içermeyen plastidlerdir ve fotosentez yapamayan dokularda çeşitli enerji kaynaklarını depolarlar. **Amiloplastlar** (Şekil 12.16B) ve **elayoplastlar** lökoplast örnekleridir ve sırasıyla nişasta ve lipid depolarlar.

Kloroplastlar dahil tüm **plastidler**, bitki kök ve filizlerindeki hızlı bölünen hücrelerde bulunan, küçük (çapı 0,5 ile 1 μm), farklılaşmamış organellerden, proplastidlerden türerler. Proplastidler daha sonra, farklılaşan hücrenin gereksinimleri doğrultusunda, çeşitli tipte olgun plastidlere dönüşürler. Ayrıca, olgun plastidler bir tipten diğerine değişebilirler (Şekil 12.17). Örneğin, meyvelerin (örn., domates) olgunlaşması sırasında kloroplastlardan

Animasyon 12.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a12.1
Proplastidden Kloroplasta İç ve dış zara sahip olan proplastid, üçüncü bir zar sistemi olan tilokoid zar ile olgun kloroplasta dönüşür.



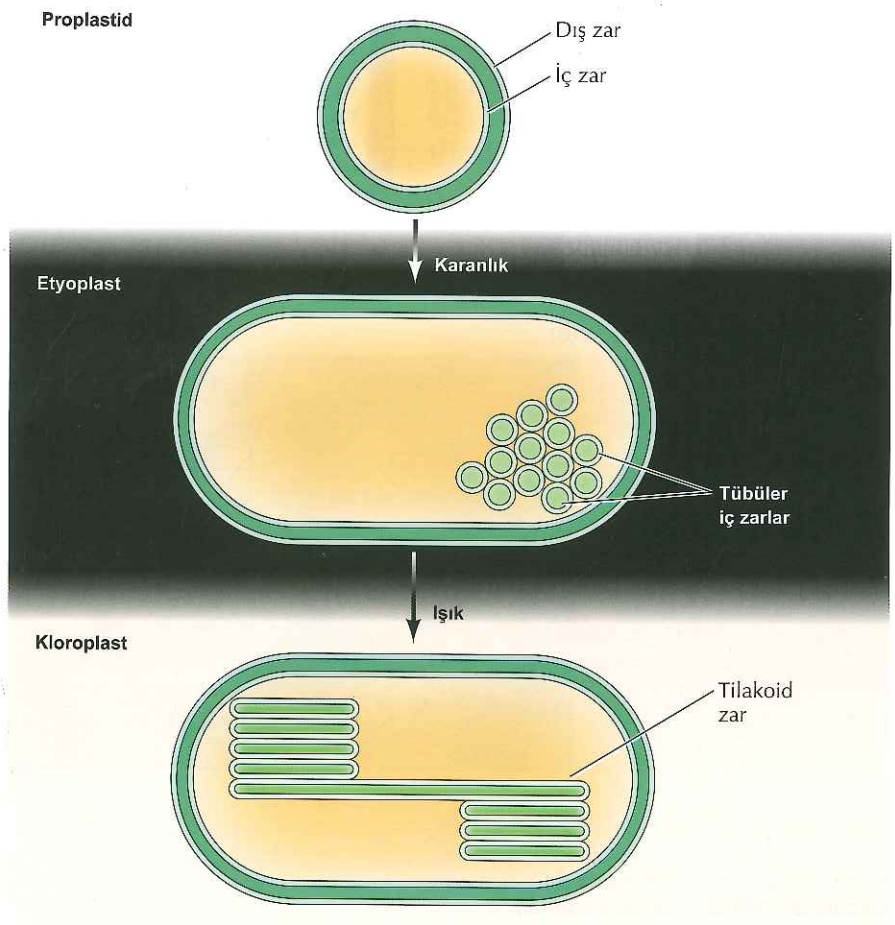
Şekil 12.16 Kloroplast ve amiloplastların elektron mikroskopu ile görüntülenmesi (A) Kloroplastlarda karotenoidlerin depolandığı lipid damlacıkları bulunur. (B) Amiloplastlar büyük nişasta granülleri içerir.



Şekil 12.17 Plastidlerin dönüşümleri Proplastidler, kloroplast, kromoplast, etyoplast, elayoplast ve amiloplastlara gelişebilir. Farklı plastidler diğer tiplere de dönüşebilir.

kromoplastlar gelişir. Bu olay sırasında, yeni tip karotenoidler sentezlenirken klorofil ve tilakoid zarlar yıkılır.

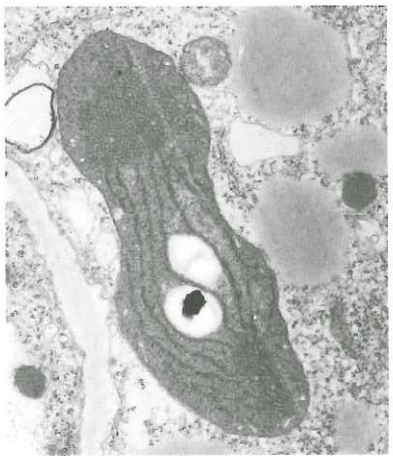
Plastidlerin ilginç bir özelliği de, gelişimlerinin hem çevresel sinyallerle hem de hücre farklılaşmasının doğal programıyla kontrol edilmesidir. Örneğin, yaprakların fotosentetik hücrelerinde proplastidler kloroplastlara gelişir (**Şekil 12.18**). Bu süreçte, plastid zarfının iç zarından tomurcuklanan veziküller tilakoid zarı oluştururken, fotosentez sisteminin çeşitli komponentleri sentezlenir ve birleştirilir. Ancak, kloroplastlar sadece ışık varlığında gelişirler. Bitkiler karanlıkta tutulacak olursa, yapraklardaki proplastidlerin gelişimi, iç zar tübüllerinin yarı kristal kümeler oluşturdukları ancak klorofilin sentezlenmediği bir ara kademede (**etyoplastlar** denir), durur (**Şekil 12.19**). Bu zarlar klorofil öncüllerine sahiptir fakat klorofil sentezlenememiştir.Karanlıkta büyütülmüş



Şekil 12.18 Kloroplastın gelişimi Kloroplastlar yaprakların fotosentetik hücrelerinde bulunan proplastidlerden gelişir. Proplastidler sadece iç ve dış zardan oluşur. Tilakoid zar, kloroplast gelişimi sırasında iç zardaki vezikülün tomurcuklanması ile oluşur. Eğer bitki karanlıkta bırakılırsa kloroplast gelişimi ara evrede (etyoplast) kalır. Etyoplastta klorofil bulunmaz ve tübüler iç zarlardaki yarı kristal dizilere sahiptir. Işık varlığında, kloroplast oluşturmak üzere gelişmeye devam ederler.

bitki daha sonra ışığa tutulacak olursa, etyoplastlar kloroplast oluşturmak üzere gelişmeye devam ederler.

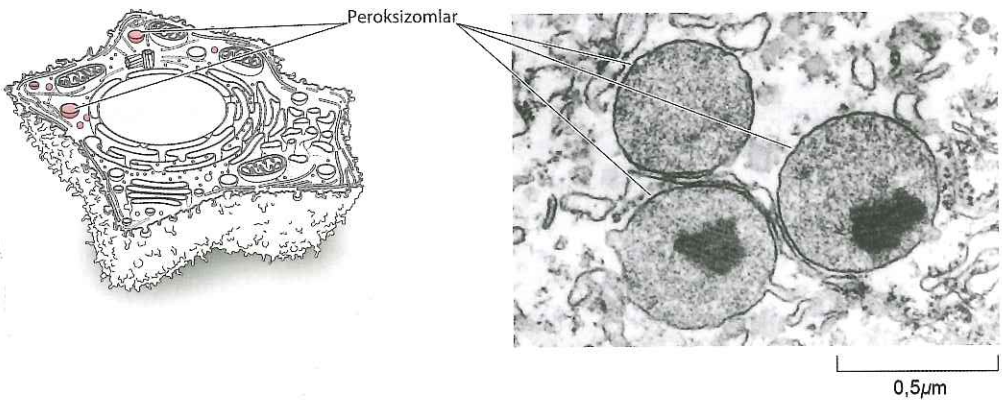
Kloroplastlar ve diğer plastidlerin içinde bulunan proteinlerin çoğu nükleer genler tarafından kodlandığından, plastid gelişiminin kontrolü plastid ve nükleer genom arasında gen ekspresyonunun koordinasyonunu gerektirir. Bu nedenle kloroplast ve diğer plastidler, nükleusa fotosentezde görev alan proteinler gibi plastid proteinleri kodlayan nükleer genlerin transkripsiyonunu düzenleyen sinyaller gönderir. Çekirdeğe doğru gerçekleşen plastid sinyal iletiminden sorumlu mekanizmaların anlaşılması, bitki moleküler biyolojisinin önemli konularından bir tanesidir.



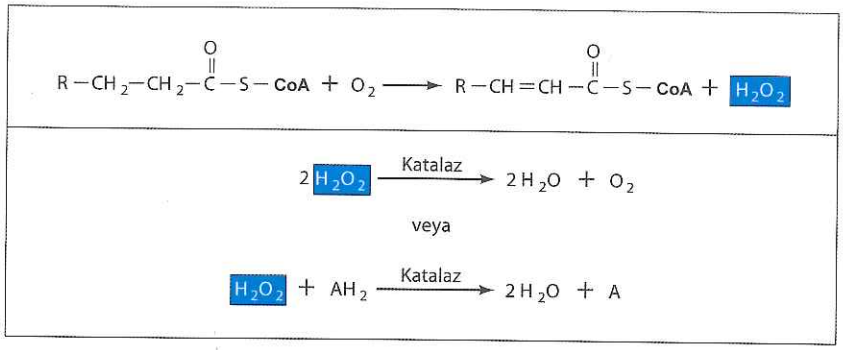
Şekil 12.19 Etyoplasta ait elektron mikroskop görüntüsü

Peroksizomlar

Peroksizomlar küçük (0,1-1 μm), tek bir zarla çevrili organellerdir (**Şekil 12.20**), enerji metabolizmasının bazı yönleri dahil çeşitli metabolik reaksiyonlarda görev alan enzimleri içerirler. Birçok insan hücresi, hücrenin metabolik aktivitesine bağlı olarak 100-1000 arası peroksizom barındırır. Peroksizomların kendilerine ait genomları yoktur ve bütün proteinleri nükleer genom tarafından sentezlenir. Mitokondri ve kloroplastalara benzer şekilde, birçok peroksizom proteini serbest ribozomlar üzerinde sentezlenir ve daha sonra peroksizomlara tamamlanmış polipeptid zincirleri şeklinde gönderilir. Ancak bazı zar proteinleri peroksizoma endoplazmik retikulumdan gönderilir. Ayrıca, mitokondri ve kloroplastalara benzer şekilde, peroksizomlar da bölünerek çoğalabilirler. Ancak bu organellerden farklı olarak hücrede tamamen kaybolsalar bile hızlı bir şekilde rejenere olabilirler. Mitokondri ve plastid proteinleri prokaryotlardaki proteinlere benzerken, peroksizom proteinleri endosimbiyotik kökenlerinden dolayı tipik ökaryot proteinleridir.



Şekil 12.20 Peroksizomlara ait elektron mikrografı Sıçan karaciğerinden gelen üç peroksizom gösterilmektedir. İki tanesi üzerinde ürat oksidaz enzimine ait parakristalin dizileri olan yoğun kısımlar bulunmaktadır.



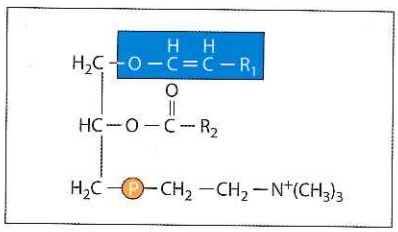
Şekil 12.21 Peroksizomlarda yağ asidi oksidasyonu Yağ asitlerinin oksidasyonuna, oksijenden hidrojen peroksid (H_2O_2) oluşumu eşlik eder. Hidrojen peroksid katalaz tarafından, suya dönüştürülerek ya da diğer organik bileşikleri (AH_2 olarak gösterilen) oksitleyerek ayrıştırılır.

Peroksizomların işlevleri

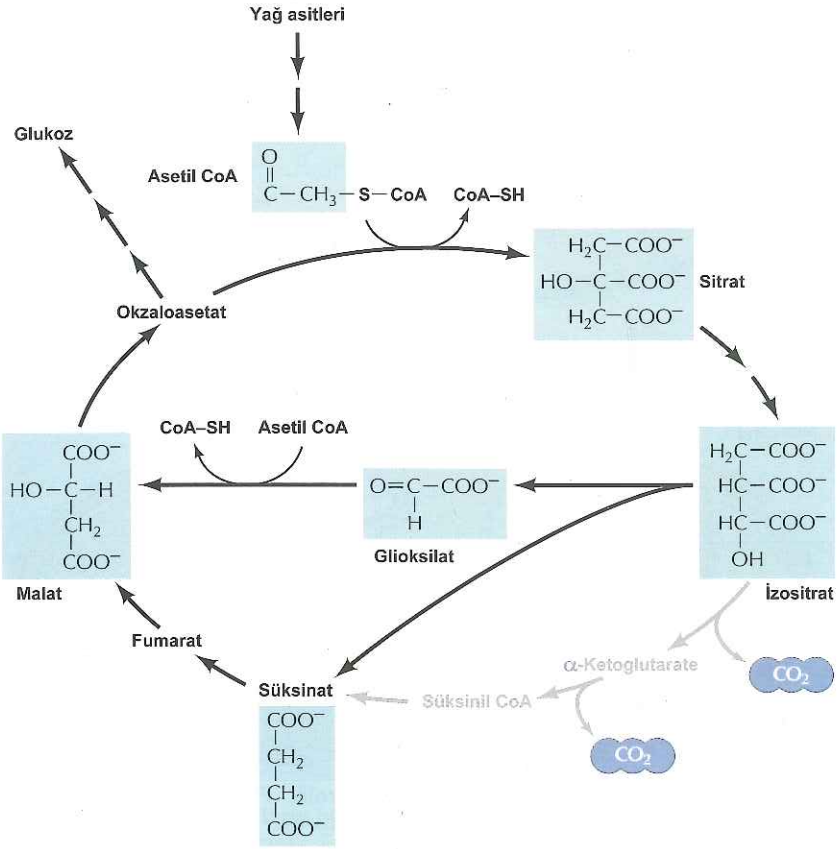
İnsan peroksizomları, belirli dokulara özgü çeşitli metabolik yolaklarda önemli olan 50'nin üzerinde farklı enzim içerir. Başlangıçta peroksizomlar, hidrojen peroksid üretimine yönelik oksidasyon reaksiyonlarının yer aldığı organeller olarak tanımlanmıştır. Hidrojen peroksidin hücre için zararlı olması nedeniyle peroksizomlar aynı zamanda, hidrojen peroksidi suya dönüştürerek veya diğer organik bileşikleri oksitlemek amacıyla kullanarak ayrıştıran **katalaz** enzimini de içerirler. Ürik asit, amino asitler, pürinler, metanol ve yağ asitleri gibi çeşitli substratlar peroksizom içerisinde bu gibi oksidatif reaksiyonlarla yıkılırlar. Yağ asitlerinin oksidasyonu (**Şekil 12.21**), metabolik enerjinin en büyük kaynağı olması nedeniyle özel öneme sahip bir örnektir. Hayvan hücrelerinde yağ asitleri hem peroksizomlarda hem de mitokondride oksitlenirken, maya ve bitki yağ asitlerinin yükseltgenmesi peroksizomlarla sınırlıdır. Memeli peroksizomları, özellikle çok uzun zincirli ve dallanmış yağ asitlerinin yıkımında rol oynar.

Yükseltgenme reaksiyonları için bir bölme sağlamalarının yanı sıra, peroksizomlar lipidlerin ve lizin amino asidinin biyosenteziyle de ilgilidirler. Hayvan hücrelerinde kolesterol ve dolikol, ER ile birlikte peroksizomlarda da sentezlenir. Peroksizomlar, karaciğerde kolesterolden türetilen safra asitlerinin sentezinde de görev alırlar. Peroksizomlar ayrıca, gliserolle ester bağı yerine eter bağı yapan hidrokarbon zincirlerinden biri olan bir fosfolipid ailesi olan **plazmalojenleri** sentezleyen enzimleri de barındırırlar (**Şekil 12.22**). Plazmalojenler, her dokuda bulunmamakla birlikte, özellikle kalp ve beyin olmak üzere bazı dokularda önemli zar bileşenleridirler.

Peroksizomların bitkilerde özellikle önemli iki işlevi vardır. Birincisi, tohumda bulunan peroksizomların depolanmış yağ asitlerinin karbohidratlara çevrilmesinden sorumlu olmalarıdır. Bu filizlenen bitkinin büyümesi için gerekli enerji ve ham maddenin sağlanması açısından son derece önemlidir ve **glioksilat döngüsü** adı verilen sitrik asit döngüsünün benzeri olan bir

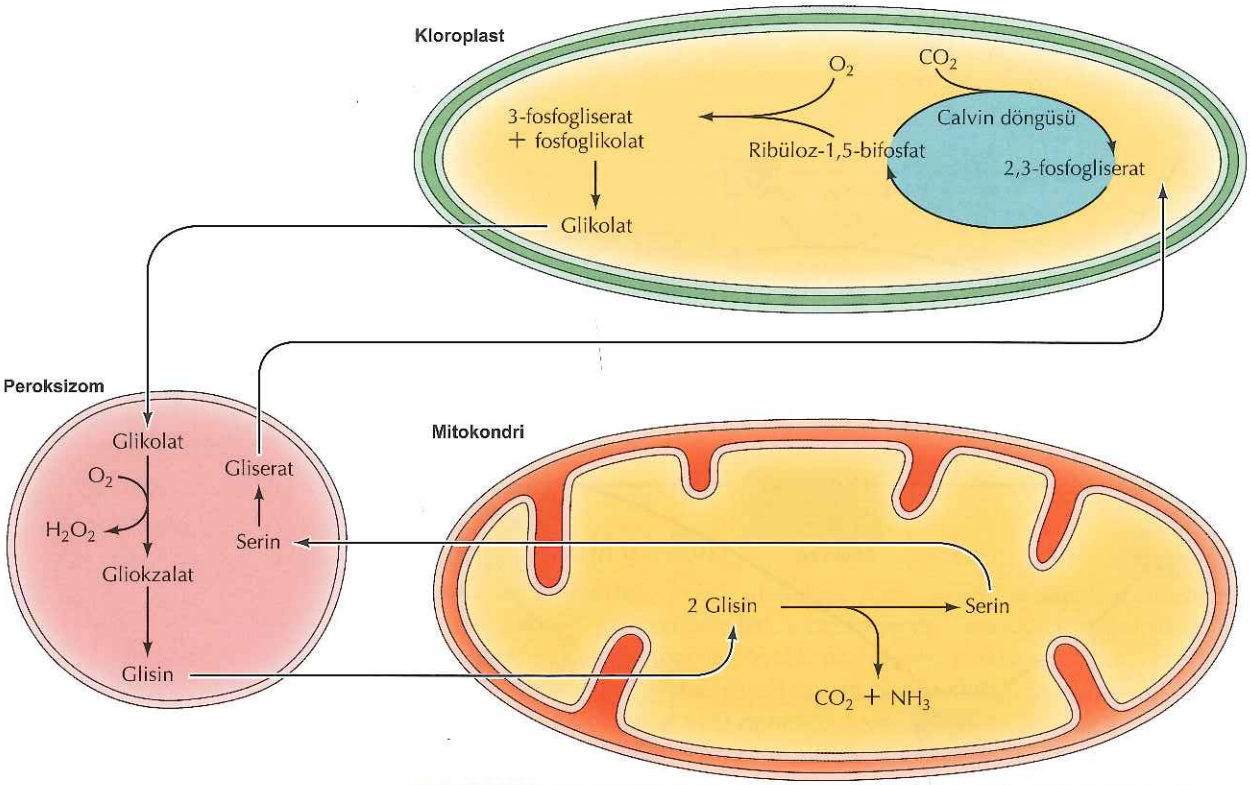


Şekil 12.22 Plazmalojen'in yapısı Görülen plazmalojen fosfatidil kolin benzeridir. Ancak, yağ asidi zincirlerinden biri gliserole ester yerine eter bağıyla bağlanmıştır.



Şekil 12.23 Glioksilat döngüsü Bitkiler sitrik asit döngüsünün bir çeşidi olan glioksilat döngüsü ile yağ asitinden karbonhidrat sentezleyebilirler (Bkz. Şekil 3.4). Sitrik asit döngüsündekine benzer şekilde asetil CoA sitrat oluşturmak üzere okzaloasetat ile birleşir ve bu da izositrata dönüştürülür. Ancak CO_2 ve α-ketoglutarat (gri oklar)'a degrade olmak yerine izostrat, süksinat ve glioksilata çevrilir. Sonrasında glioksilat, okzaloasetata çevrilen ve glukoz sentezinde kullanılan malatı oluşturmak üzere bir tane daha asetil CoA molekülü ile reaksiyona girer.

dizi reaksiyonlarla gerçekleşir (**Şekil 12.23**). İçinde bu döngünün yer aldığı peroksizomlar bazen **glioksozom** olarak adlandırılır. İkinci olarak, yapraktaki peroksizomlar, fotosentez sırasında ortaya çıkan bir yan ürünü metabolize eden **fotosolunum** ile ilgilidirler (**Şekil 12.24**). Fotosentez sırasında CO_2 Calvin döngüsü denilen bir dizi reaksiyonla karbohidratlara dönüştürülür (bkz. Şekil 3.15). İlk aşama, CO_2'in iki molekül 3-fosfogliserat (her birinde üç karbon) oluşturmak üzere beş-karbonlu şeker ribüloz 1,5-bisfosfat'a eklenmesidir. Ancak bazen, ilgili enzim (ribüloz bisfosfat karboksilaz ya da rubisco) CO_2 yerine O_2 bağlanmasını katalizleyerek bir molekül 3-fosfogliserat ve bir molekül fosfoglikolat (iki karbonlu) oluşturur (Bkz. Şekil 12.24). Bu gerçekleştiğinde, fosfoglikolat glikolata dönüştürüldükten sonra peroksizomlara aktarılır ve burada oksitlenerek glisine çevrilir. Glisin daha sonra mitokondriye aktarılır ve burada iki molekül glisin, CO_2 ve NH_3'ün kaybıyla bir molekül serine dönüştürülür. Serin daha sonra gliserata dönüştürüldüğü peroksizomlara geri döner. Son olarak, gliserat kloroplasta geri gönderilir ve yeniden Calvin döngüsüne katılır. Aslında fotosentezin karşıtı olup, hiç ATP üretmeden O_2

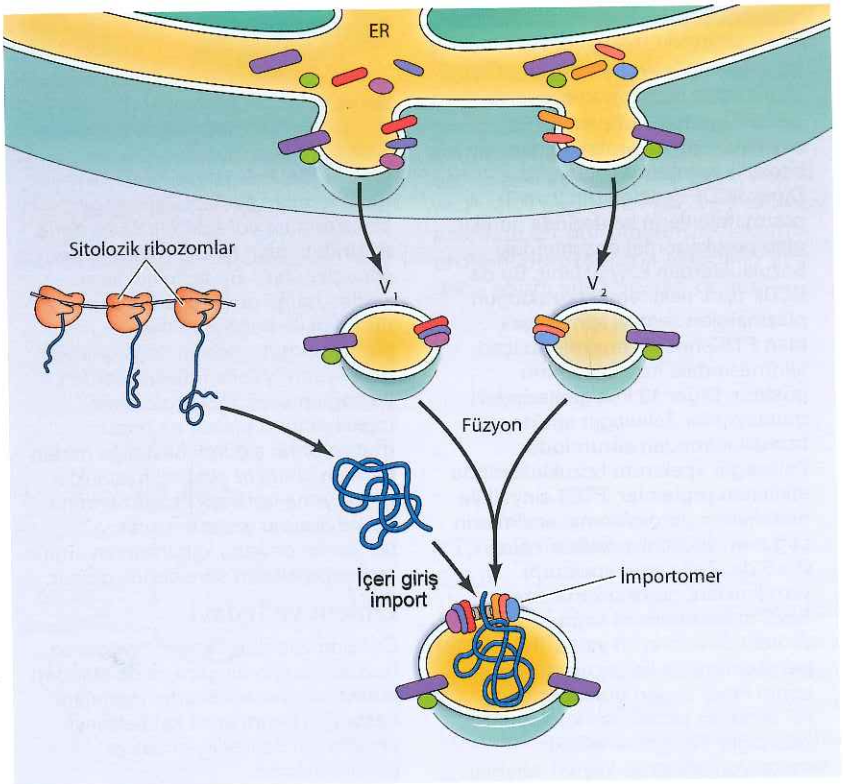


Şekil 12.24 Fotosolunumda peroksizomların rolü Fotosentez sırasında Calvin döngüsü ile, CO_2 karbohidratlara dönüştürülür ve bu döngü CO_2'in beş karbonlu bir şeker olan ribüloz 1,5- bisfosfata eklenmesiyle başlar. Ancak bazen ilgili enzim CO_2 yerine O_2 eklenmesini katalizler ve bunun sonucunda iki karbonlu bir bileşik olan fosfoglikolat üretilir. Glikolata dönüşen fosfoglikolat daha sonra peroksizomlara iletilir ve burada oksitlenerek glisine dönüştürülür. Mitokondriye taşınan glisin serine dönüştürülür. Serin yeniden peroksizomlara döner ve tekrar kloroplasta gönderilmek üzere gliserata dönüştürülür.

kullanıp CO_2 oluşturduğundan, fotosolunumun bitkiye bir yararı yoktur. Ancak, arada sırada CO_2 yerine O_2 kullanımı rubisco'nun doğal özelliği olduğundan fotosolunum genellikle fotosenteze eşlik eder. Bu nedenle peroksizomlar, glikolat yapısındaki karbonların çoğunun geri kazanılmasını ve kullanılmasını sağlayarak önemli bir rol oynarlar.

Peroksizom yapılanması

Peroksizomların yapılanması serbest sitozolik ribozomlar üzerinde sentezlenen ve ER'den peroksizomlara taşınan proteinler üzerinden gerçekleşir. İç kısımda yerleşen peroksizomal proteinler, serbest sitozolik ribozomlar üzerinde sentezlenir ve daha sonra peroksizomlara alınırlar, ancak birçok peroksizomal transmembran protein peroksizomlara ER'den taşınırlar. Bu transmembran proteinler, metabolitlerin taşınmasında rol oynayan proteinleri ve **peroksin** ya da **Pex proteinleri** olarak adlandırılan ve peroksizom yapılanmasında rol oynayan proteinleri de kapsamaktadır. Peroksinlerdeki mutasyonlar, mayalarda tanımlanmıştır ve bunlar insanlarda hatalı peroksizom yapılanması



Şekil 12.25 Peroksizomların birleşmesi Peroksizomların transmembran proteinleri ER'den köken alır. Farklı transmembran proteinleri taşıyan iki farklı tip vezikül (V_1 ve V_2) fonksiyonel bir peroksizom oluşturmak üzere birleşir. Bu farklı proteinlerin birleşimi sitozolik ribozomlar üzerinde sentezlenen, iç peroksizom proteinlerinin içeriye alınmasını sağlayan bir düzeneği (importomer) oluşturur.

sonucu gelişen çeşitli hastalıklar **(peroksizom biyogenez bozuklukları)** ile ilişkilidir. Aşağıda tartışıldığı üzere bazı peroksinler, peroksizomların iç (matriks) proteinlerinin içeri alındığı zar kanalları oluşturur.

Birçok transmembran proteini önce ER'ye doğru ilerler ve ER zarına yerleşir (Bölüm 11). Bu proteinler daha sonra, peroksizomal ER olarak tanımlanan ER'nin belirli bir bölgesinden veziküller halinde tomurcuklanır (Şekil 12.25). Peroksizomal ER'den vezikül tomurcuklanması ER'den tomurcuklanan diğer veziküllerden farklı olarak, COPII kılıfına sahip değildir ve oluşumları peroksizomlar üzerinden gerçekleşebilir. Peroksizomal ER'den gelen veziküller Golgi aygıtına hedeflenmek yerine, matriks proteinlerinin içeri alınabileceği peroksizomları oluşturmak üzere birleşir. Fonksiyonel bir peroksizomun oluşumu farklı çeşitlerde peroksinler içeren ve her ikisi de matriks proteinlerinin alınması için gerekli olan iki farklı vezikül tipinin birleşmesi ile gerçekleşir.

Peroksizom matriks proteinlerinin translasyonu serbest sitozolik ribozomlar üzerinde gerçekleşir. Daha sonra, tamamlanmış ve katlanmış polipeptidler olarak peroksizomlara alınırlar. Bu proteinler peroksizomlara, mayadan

Peroksizom Biyogenez Hastalıkları

Hastalık

Çeşitli hastalıklar peroksizomlardaki metabolik aktiviteleri bozan mutasyonların sonucunda gerçekleşir. Bu hastalıkların bazıları tek bir peroksizomal enzim kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanır. Bunun aksine peroksizomal biyogenez bozukluğu, peroksizom birleşmesinden sorumlu Pex proteinlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır. Bu nedenle, peroksizomlarda bulunan enzimlerin çoğu ya da tamamının fonksiyonel bozukluğa yol açma potansiyeli bulunur. Peroksizomal biyogenez bozukluklarının insidansı 1/50.000 olup, çekinik genetik hastalıklardır. Bu bozuklukların Zellweger spektrum bozuklukları ve rizomelik kondrodisplazi punktata (RCDP) tip 1 olmak üzere iki farklı çeşidi bulunur. Zellweger spektrum bozukluklarının şiddetleri farklıdır. En şiddetlisi Zellweger sendromu, orta şiddetlisi neonatal lökodistrofi (NALD) ve daha hafif tipi infantil Refsum hastalığı (IRD) dır. Zellweger sendromlu hastalar genellikle bebeklik döneminde ölürlerken, NALD'li olan hastalar ergenliğe ve IRD'li olanlar ise erişkinliğe kadar yaşayabilir. Semptomları arasında gelişme geriliği, yüzde tipik anomaliler, işitme ve görme kaybı ve karaciğer fonksiyon bozukluğu bulunur. RCDP tip 1, Zellweger sendrom bozukluğundan farklıdır ve kol ve bacaklarda kısalık, ufak bedensel yapı, katarakt ve psikomotor retardasyon ile tanımlanır. RCDP'li hastaların bazıları bebeklik dönemlerinde hayatlarını kaybederken, diğerleri erişkinliğe kadar yaşar.

Moleküler ve Hücresel Temel

Peroksizomların yapılanması için gerekli olan 14 farklı *Pex* genindeki mutasyonların peroksizom biyogenez bozukluklarına (Tabloya bakınız) yol açtığı bulunmuştur. RCDP tip 1, spesifik olarak *Pex 7* deki mutasyonlardan kaynaklanır. *Pex 7*, PTS2 hedefleyici sinyali ile peroksizomlara hedeflenen az sayıdaki matriks proteinini tanıyan bir sitozolik reseptörü kodlar. Diğer RCDP çeşitleri (tip 2 ve 3) plazmalojenlerin sentezinde gerekli olan peroksizomal enzimlerdeki bozukluklardan kaynaklanır. Bu da RCDP tip 1'deki temel bozukluğun plazmalojen sentezi için gerekli olan PTS2 hedefli enzimlerin içeri alınmasındaki hata olduğunu gösterir. Diğer 13 Pex genlerindeki mutasyonlar Zellweger spektrum bozukluklarından sorumludur. Zellweger spektrum bozukluklarında etkilenen proteinler, PTS1 sinyali ile hedeflenen peroksizomal enzimlerin çoğunun sitozolik reseptörü olan Pex5'dir. Zellweger spektrum bozuklukları, peroksizomal zara Pex5'in tutunmasını sağlayan proteinleri kodlayan ya da peroksizomlara kargo ulaştıktan sonra Pex5'in geri dönüşümünde rol oynayan proteinleri kodlayan bazı diğer Pex genlerindeki mutasyonlardan da kaynaklanabilir (bakınız Şekil 12.26). Buna ek olarak, Zellweger spektrum bozuklukları, peroksizom zar proteinlerinin içeri alınmasında rol oynayan bazı Pex proteinlerindeki hatalar ile de gelişebilir (bakınız Şekil 12.27). Son olarak peroksizomların bölünmesi için gerekli olan bir protein kodlayan *Pex* genindeki mutasyonlar da Zellweger spektrum bozukluklarına neden olabilir. Bu *Pex* genlerindeki farklı mutasyonlar, şiddetli Zelleweger sendromuna yol açabilir. Ya da daha az şiddetli olan NALD veya IRD ile sonuçlanabilir. Bu bozuklukların şiddeti hangi genin mutasyona uğradığı ile doğrudan ilişkili olmayıp, mutasyonun doğasına ve peroksizom yapılanmasına etkileri ile bağlantılıdır. *Pex* proteininin fonksiyonunu tamamen bozan mutasyonlar şiddetli hastalığa neden olurken, daha az şiddetli hastalıklar mutasyona uğrayan Pex proteininin fonksiyonunu azaltan, ancak tamamen ortadan kaldırmayan amino asit değişiklikleri sonucunda oluşur.

Önlem ve Tedavi

Günümüzde peroksizom biyogenez bozukluğu için bir çare ya da standart tedavi bulunmamaktadır. Hastalara hastalığın belirtilerini hafifletmeyi amaçlayan destekleyici bakım sunulmaktadır.

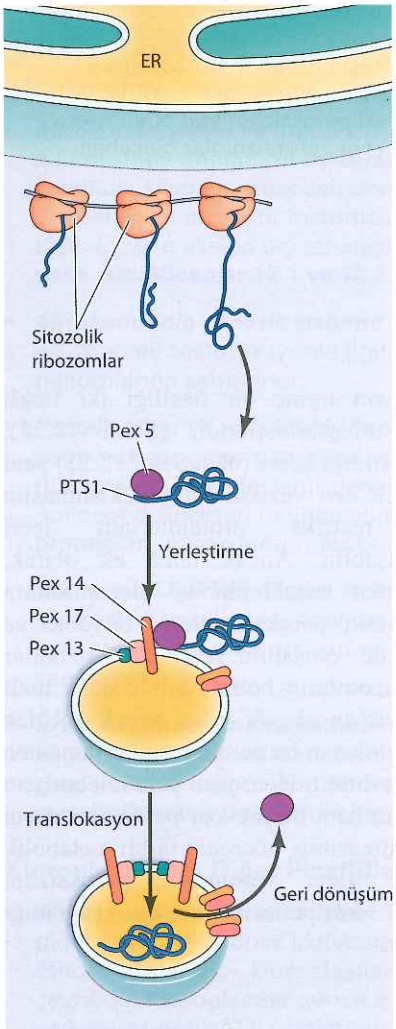
Kaynak

Waterham, H. R. and M. S. Ebberink. 2012. Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disordes. *Biochim. Biophys. Acta* 1822: 1430-1441.

Peroksizom Biyogenez Bozuklukların Peroksin Mutasyonları

Pex geni	Protein fonksiyonu	Hastalık
*Pex*7	PTS2 hedefli matriks proteinleri için sitozolik reseptör	RCDP tip 1
*Pex*5	PTS1 hedefli matriks proteinleri için sitozolik reseptör	Zellweger spektrum bozuklukları
*Pex*1,2,6,10,12,26	Pex5'in geri dönüşümü	
*Pex*13,14	Pex5'e bağlanma	
*Pex*19	Peroksizom zar proteinleri için sitozolik reseptör	
*Pex*3, 16	Pex19 bağlanma ve zar proteinlerinin insersiyonu	
*Pex*11β	Peroksizomların bölünmesi	

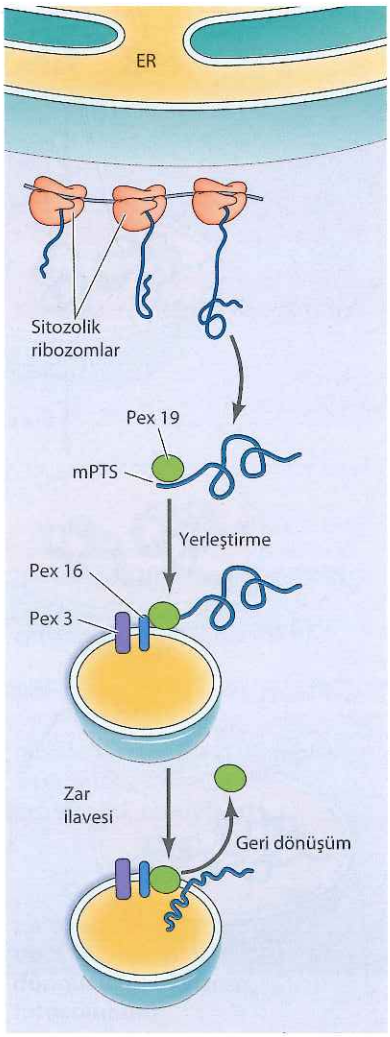
insana kadar korunmuş olan iki yolak üzerinden hedeflenirler. Birçok protein peroksizomlara karboksi uçlarındaki Ser-Lys-Leu basit amino asit dizisi (peroksizom hedef sinyali 1, PTS1) ile hedeflenir. Az sayıda protein ise amino uçlarındaki dokuz amino asitten oluşan sekans (peroksizom hedef sinyali 2,



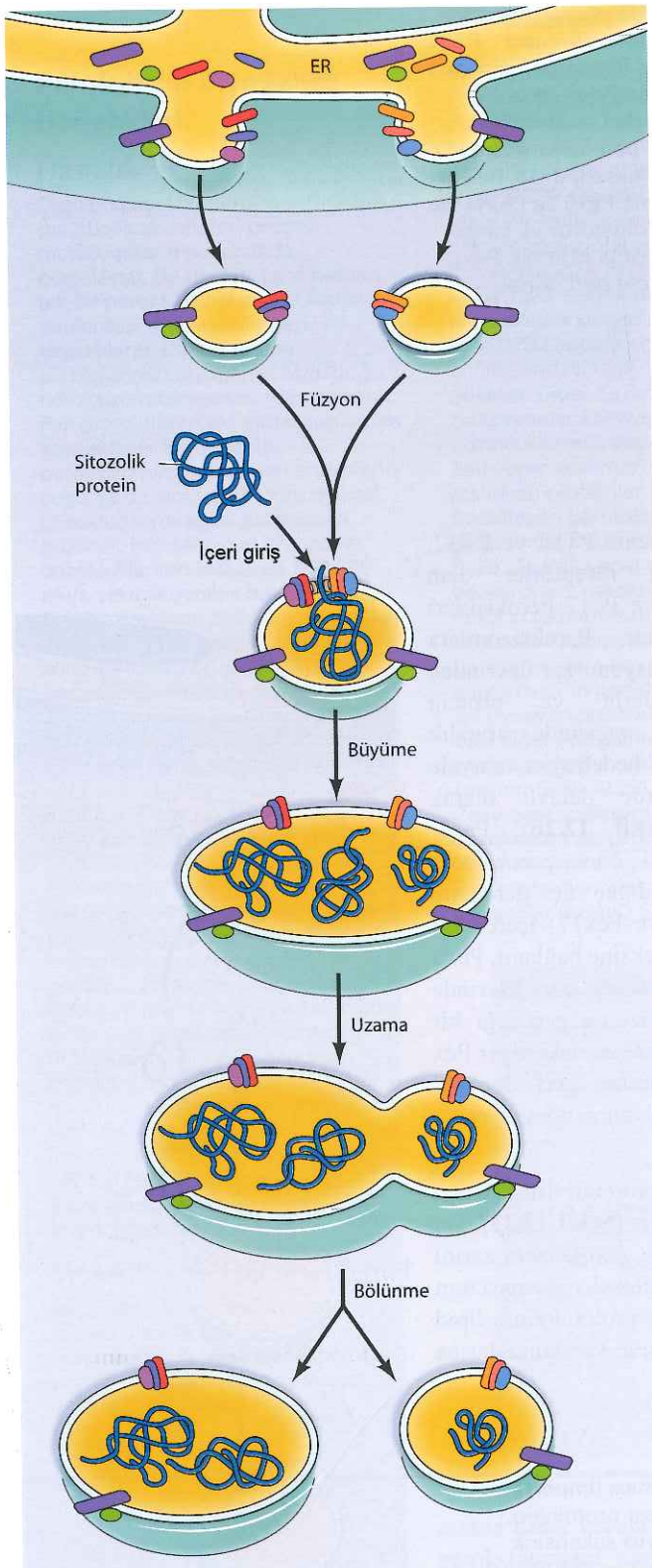
Şekil 12.26 Peroksizomal matriks proteinlerinin içeriye alınması PTS1 hedefleyici sinyal içeren perosizomal matriks proteinleri Pex5 sitozolik reseptörü tarafından tanınır. Pex5/kargo kompleksi peroksizom zarı üzerindeki komplekse (Pex13, Pex14 ve Pex17) bağlanır. Pex5 ve Pex14 zar üzerinde bir por oluşturur ve kargo proteini peroksizoma aktarılır. Pex5 daha sonra sitozole geri döner.

PTS2) ile hedeflenir. PTS1 ve PTS2, farklı sitozolik reseptörler olan sırasıyla, Pex5 ve Pex7 peroksinleri tarafından tanınır. Peroksizomlara protein translokasyonu zar üzerinden büyük proteinlerin ve protein komplekslerinin geçişinde aracılık eder ve PTS1 hedefleyici sinyale sahip proteinlerde detaylı olarak çalışılmıştır (Şekil 12.26). Pex5/kargo kompleksi önce peroksizom zarı üzerinde, diğer üç peroksini (Pex13, Pex14 ve Pex17) içeren bir bağlanma kompleksine bağlanır. Pex5 ve Pex14 sonrasında zar üzerinde kargonun peroksizoma geçeceği bir por oluşturur. Pex5, zardaki diğer Pex proteinleri tarafından geri dönüşür ve sonraki kargo alım döngülerinde kullanılır.

Sadece iç matriks proteinleri değil bazı peroksizom zar proteinleri de ER'den taşınmak yerine, sitozolik ribozomlar üzerinde sentezlenir (Şekil 12.27). Bu proteinler, Pex19 sitozolik reseptörü tarafından tanınan ve peroksizom zarını hedefleyen bir sinyale (mPTS) sahiptir. Pex19/kargo kompleksleri peroksizom zarındaki Pex3 ve Pex16 tarafından tanınır. Pex19, kargo proteinlerinin lipid çift tabakaya dahil olmasının yanısıra, kompleksler halinde yapılanmalarına aracılık eder.



Şekil 12.27 Peroksizom zar proteinlerinin sitozolden alınması (import) Sitozoldeki ribozomlar üzerinde sentezlenen peroksizomal zar proteinleri, Pex19 sitozolik reseptörü tarafından tanınan mPTS hedefleyici sekansına sahiptir. Pex19/kargo kompleksleri peroksizom zarındaki Pex3 ve Pex16'ya bağlanır. Pex19, kargonun zara yerleşimini ve lipid çift tabaka içerisinde protein komplekslerinin birleşmesini düzenler. Pex19 daha sonra sitozole geri döner.



Şekil 12.28 Yeni peroksizomların oluşumu Yeni peroksizomlar *de novo* şekilde sitozolik proteinlerin içeri alınması sonrası ER'den tomurcuklanan veziküllerin füzyonu ile oluşur (bkz. Şekil 12.25). Buna ek olarak, eski peroksizomların büyümesi ve bölünmesi ile de yeni peroksizomlar oluşabilir.

Peroksizomların ilginç bir özelliği iki farklı mekanizma ile oluşabilmeleridir (Şekil 12.28). Önceden de tartışıldığı üzere (bkz. Şekil 12.25) yeni peroksizomlar ER'den vezikül tomurcuklanmasını takip eden matriks proteinlerinin içeri alınmasıyla oluşabilir. Ancak buna ek olarak, yeni peroksizomlar mitokondri ve kloroplastlara benzer şekilde eski peroksizomların büyüme ve bölünmesi ile de oluşabilir.Yeni peroksizomlar var olan peroksizomların bölünmesiyle daha hızlı bir şekilde oluşur ancak, *de novo* olarak ER'den tomurcuklanarak oluşan bu peroksizomlar tamamen yeni bir içeriğe sahiptir. Hem yeni peroksizomların *de novo* oluşumu, hem de mevcut peroksizomların büyüme ve bölünmesinin, hücrenin farklı metabolik gereksinimlerine yanıt vermesiyle peroksizom popülasyonunun korunmasına katkı sağladığı düşünülmektedir.

ÖZET

Mitokondri

- ***Mitokondri yapısı ve organizasyonu:*** Metabolik enerji elde edilmesinde önemli rol oynayan mitokondriler çift zar sistemiyle çevrilidir. Matriks, sitrik asit döngüsü enzimlerini içerir, iç zar elektron taşınması ve oksidatif fosforilasyonda görevli protein kompleksleri taşır. İç zarın aksine dış zar küçük moleküllerin serbest geçişine izin verir. Bkz. **Videolar 12.1 ve 12.2.**

- ***Mitokondrinin genetik sistemi:*** Mitokondriler, rRNA'ları, tRNA'ları ve oksidatif fosforilasyonla ilgili bazı proteinleri kodlayan, kendi genomlarına sahiptirler.

- ***Protein alımı ve mitokondri yapılanması:*** Mitokondri proteinlerinin çoğu nükleer genom tarafından kodlanır. Bu proteinler serbest ribozomlar üzerinde sentezlenir ve mitokondri içine tamamlanmış polipeptid zincirleri halinde alınırlar. Pozitif yüklü öncül dizi proteinleri, mitokondri matriksine alınmak üzere yönlendirirler.

- ***Mitokondri lipidleri:*** Birçok fosfolipid mitokondriye fosfolipid transfer proteinleri aracılığıyla, endoplazmik retikulumdan taşınır. Mitokondri ayrıca dört yağ asidi taşıyan nadir bir fosfolipid olan kardiyolipini sentezler.

- ***İç zar üzerinden metabolitlerin taşınması:*** İç zarın birçok protein, küçük molekülleri mitokondrinin içine ve dışına taşır. Proton gradiyentinde depolanan potansiyel enerji, ATP, ADP ve diğer metabolitlerin mitokondri içine ve dışına taşınmasında rol oynar.

Kloroplastlar ve Diğer Plastidler

- ***Kloroplastların yapısı ve işlevi:*** Kloroplastlar fotosentezde ve diğer çeşitli metabolik aktivitelerde iş gören büyük organellerdir. Mitokondriler gibi, kloroplastlar da çift zardan oluşan bir zarfla çevrilidir. Kloroplastlar ayrıca iç kısımda, elektron taşınmasının ve kemiozmotik ATP üretiminin gerçekleştiği bölge olarak tilakoid zarlara sahiptirler. Bkz. **Video 12.3.**
- ***Kloroplast genomu:*** Kloroplast genomu rRNA'lar, tRNA'lar, bazı ribozomal proteinler, RNA polimeraz ve fotosentez ile metabolizmada görevli proteinleri kodlayan, yaklaşık 150 gen içerir.
- ***Kloroplast proteinlerinin içeri alınması ve tasnifi:*** Kloroplast proteinlerinin çoğu sitozoldeki serbest ribozomlarda sentezlenir ve amino- ucu transit peptidleri aracılığıyla, kloroplast içerisine alınmak üzere hedeflenir. Tilakoid boşluğa aktarılan proteinlerin birçoğu önce kloroplast stromasına gönderilir ve sonrasında tilakoid zar üzerinden farklı birkaç yolak ile taşınır.
- ***Diğer plastidler:*** Kloroplast, aynı genoma sahip benzer organeller ailesinin sadece bir üyesidir. Diğer plastidler nişasta ya da lipidler gibi enerji kaynaklarını depolarlar ve bitki metabolizmasının diğer alanlarında işlev görürler. Bkz. **Animasyon 12.1**

Peroksizomlar

- ***Peroksizomların işlevleri:*** Peroksizomlar tek zarla çevrili, yağ asidi oksidasyonu, lipid biyosentezi, gliokzalat döngüsü ve fotosolunum gibi çeşitli metabolik reaksiyonlarda görev alan enzimleri içeren küçük organellerdir

ANAHTAR SÖZCÜKLER

mitokondri, krista, matriks, porin

endosimbiyoz

öncül dizi, Tom kompleksi, Tim kompleksi, matriks işlemleyici peptidaz (MPP)

fosfolipid transfer proteini, kardiyolipin

kloroplast, tilakoid zar, stroma

transit peptidi, Toc kompleksi, Tic kompleksi, stroma işlemleyici peptidazı (SPP)

plastid, kromoplast, lökoplast, amiloplast, elayoplast, proplastid, etyoplast

peroksizom, katalaz, plazmalojen gliokzalat döngüsü, glioksizom, fotosolunum

ÖZET

- ***Peroksizom yapılanması:*** Birçok transmembran protein ER'den peroksizomlara taşınırken, iç peroksizomal proteinler sitozolde bulunan serbest ribozomlar üzerinde sentezlenir ve peroksizomlara tamamlanmış ve katlanmış polipeptid zincirleri olarak alınırlar. Peroksinler hem ER'den *de novo* olarak, hem de mevcut peroksizomların büyümesi ve bölünmesi ile oluşur.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

peroksin, Pex proteini, peroksizom biyogenez bozuklukları

Atıf

Hücre

Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Sorular

1. Mitokondri iç zarının olağan dışı yüksek metabolik aktivitesi hangi iki özelliğine bağlıdır?
2. Standart "wobble" kuralına göre, sitozoldeki protein sentezi en az 30 farklı tRNA gerektirir. İnsan mitokondrisi, sadece 22 tRNA ile mRNA'ları okumayı nasıl başarır?
3. Mitokondriye protein alımı sırasında moleküler şaperonlar nasıl rol oynar?
4. Metabolitlerin mitokondri içine ve dışına taşınması için gerekli olan enerjiyi ne sağlar?
5. Kloroplastların tilakoid zarı, mitokondri iç zarı ile nasıl ilişkilidir?
6. Kloroplast proteinlerinin transit peptidleri, mitokondri proteinlerine ait öncül dizilerin aksine, neden pozitif yüklü olmak durumunda değildir?
7. Tilokoid lümende bulunan bir protein üzerinde çalışıyorsunuz ve proteinin tilakoid zardan geçişini hedefleyen bir sinyal dizi tanımladınız. Eğer bu sinyal diziyi çıkartacak şekilde ilgili geni mutasyona uğratırsanız protein nerede bulunacaktır?
8. Kloroplastlar kromoplastlardan nasıl farklıdır?
9. Zar proteinleri peroksizomlara nasıl hedeflenir?
10. Pex5'i hedefleyen siRNA'nın peroksizomun birleşmesinde etkisi ne olur?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

(Her ana bölüm için en önemli anahtar derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Mitokondri

Andreux, P. A., R. H. Houtkooper and J. Auwerx. 2013. Pharmacological approaches to restore mitochondrial function. *Nature Rev. Drug Discovery* 12: 465-483. [R]

Blackstone, C. and C. R. Chang. 2011. Mitochondria unite to survive. *Nature Cell Biol.* 13: 521-522. [R]

Chacinska , A., C. M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow and N. Pfanner. 2009. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138: 628-644. [R]

Chen, X. J. and R. A. Butow. 2005. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature Rev. Genet.* 6: 815-825. [R]

Dudek, J., P. Rehling and M. van der Laan. 2013. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 274-285. [R]

Farrar, G. J., N. Chadderton, P. F. Kenna and S. Millington-Ward. 2013. Mitochondrial disorders: aetiologies, model systems, and candidate therapies. *Trends Genet.* 29: 488-497.

Friedman, J. R. and J. Nunnari. 2014. Mitochondrial form and function. *Nature* 505: 335-343. [R]

Lev, S. 2010. Non-vesicular lipid transport by lipid-transport proteins and beyond. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 739-750. [R]

Mishra, P. and D. C. Chan. 2014. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 634-646. [R]

Neupert, W. and J. M. Herrmann. 2007. Translocation of proteins into mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 723-749. [R]

Park, C. B. and N.C. Larsson. 2011. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J. Cell Biol.* 193: 809-818. [R]

Schmidt, O., N. Pfanner and C. Meisinger. 2010. Mitochondrial

protein import: from proteomics to functional mechanisms. ***Nature Rev. Mol. Cell Biol.*** **11: 655-667. [R]**

Schulz, C., A. Schendzielorz and P. Rehling. 2015. Unlocking the presequence import pathway. *Trends Cell Biol.* 25: 265-275. [R]

Tatsuta, T., M. Scharwey and T. Langer. 2014. Mitochondrial lipid trafficking. *Trends Cell Biol.* 24: 44-52. [R]

Kloroplastlar ve Diğer Plastidler

Albiniak, A. M., J. Baglieri and C. Robinson. 2012. Targeting of lumenal proteins across the thylakoid membrane. *J. Exptl. Botany* 63: 1689-1698. [R]

Andres, C., B. Agne and F. Kessler. 2010. The TOC complex: preprotein gateway to the chloroplast. Biochim. *Biophys. Acta* 1803: 715-723. [R]

Flores-Perez, U. and P. Jarvis. 2013. Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 332-340. [R]

Green, B. R. 2011. Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *Plant J.* 66: 34-44. [R]

Inoue, K. 2011. Emerging roles of the chloroplast outer envelope membrane. *Trends Plant Sci.* 16: 550-557. [R]

Jarvis, P. and E. López-Juez. 2013. Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. ***Nature Rev. Mol. Cell Biol.*** **14: 787-802. [R]**

Kovacs-Bogdan, E., J. Soll and B. Bolter. 2010. Protein import into chloroplasts: the Tic complex and its regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1803: 740-747. [R]

Lee, D. W., C. Jung and I. Hwang. 2013. Cytosolic events involved in chloroplast protein targeting. *Biochim. Biophys. Acta* 1833:245-252. [R]

Li, H. M. and C.-C. Chiu. 2010. Protein transport into chloroplasts. *Ann. Rev. Plant Biol.* 61: 157-180. [R]

Shi, L.-X. and S.M. Theg. 2013. The chloroplast protein import system: from algae to trees. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 314-331. [R]

Wang, P. and R. E. Dalbey. 2011. Inserting membrane proteins: The YidC/Oxa1/ Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1808: 866-875. [R]

Peroksizomlar

Agrawal, G. and S. Subramani. 2013. Emerging role of the endoplasmic reticulum in peroxisome biogenesis. *Front. Physiol.* 4: 286. [R]

Hasan, S., H. W. Platta and R. Erdmann. 2013. Import of proteins into the peroxisomal matrix. *Front. Physiol.* 4: 261. [R]

Hoepfner, D., D. Schildknegt, L. Braakman, P. Philippsen and H. F. Tabak. 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 122: 85-95. [P]

Smith, J. J. and J. D. Aitchison. 2013. Peroxisomes take shape. ***Nature Rev. Mol. Cell Biol.*** **14: 803-817. [R]**

Tabak, H. F., I. Braakman and A. van der Zand. 2013. Peroxisome formation and maintenance are dependent on the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 82: 723-744. [R]

Wanders, R. J. A. 2014. Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* 98: 36-44. [R]

Waterham, H. R. and M. S. Ebberink. 2012. Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 1822: 1430-1441. [R]

BÖLÜM 13

Hücre İskeleti ve Hücre Hareketi

Aktin Filamanlarının Yapısı ve Organizasyonu 479
Miyozin Motorları 493
Mikrotübüller 501
Mikrotübül Motorları ve Hareketleri 508
Ara Filamanlar 520
Anahtar Deney
Kinezin İzolasyonu 509
Anahtar Deney
Anormal Deri Gelişimine Neden Olan Mutant Keratinlerin Ekspresyonu 525

Önceki bölümde incelenen zarla çevrili organeller ökaryot hücrelerin alt yapı organizasyonunda bir düzeyi simgeler. Tüm ökaryot hücrelerde sitoplazmaya dağılan protein filamanları ağından oluşan hücre iskeleti ile daha ileri düzeyde bir organizasyon sağlanır. Hücre iskeleti hücre için yapısal bir çerçeve sağlar, hücre şeklini ve sitoplazmanın organizasyonunu belirleyen bir yapı iskelesi görevi yapar. Bu yapısal görevlerine ek olarak, hücre iskeleti hücre hareketlerinin gerçekleşmesinden sorumludur. Hücre hareketleri, yalnızca hücrelerin bütünsel hareketlerini değil, aynı zamanda organellerin ve diğer bazı yapıların (mitotik kromozom gibi) sitoplazma boyunca hücre içinde taşınmasını da içerir. Hücre iskeleti, adının çağrıştırdığı kadar sert ve değişmez bir yapı değildir. Bunun yerine örneğin hücre bölünmesi sırasında hücrelerin hareket etmesi ve şekil değiştirmesi için sürekli yeniden düzenlenen dinamik bir yapıdır.

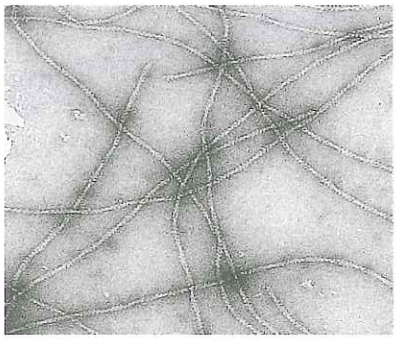
Hücre iskeleti üç temel protein filaman tipinden oluşmuştur: aktin filamanları, ara filamanlar ve mikrotübüller. Bunlar bir arada bulunurlar ve çok sayıda aksesuar protein aracılığı ile hücre içi organeller ve plazma zarı ile bağlantılıdırlar. Bu bölümde hücre iskeletinin bu üç ana elemanının her birinin yapı ve organizasyonu ile aktin filamanlarının ve mikrotübüllerin hücre hareketi, organel taşınması, hücre bölünmesi ve diğer hücre hareketi tiplerindeki rolleri incelenecektir.

Aktin Filamanlarının Yapısı ve Organizasyonu

Çoğu hücre içinde en fazla bulunan hücre iskeleti proteini **aktindir,** aktin proteini aktin filamanlarına polimerleşir bu ince, esnek lifler yaklaşık 7 nm çapında ve birkaç mikrometre uzunluğundadır (**Şekil 13.1**). Hücre içinde aktin filamanları (aynı zamanda **mikrofilamanlar** olarak da adlandırılır) yarı katı jel özelliğinde paketler, ya da üç boyutlu ağ yapısı oluşturacak, çok iyi-düzenlenmiş bir yapı halinde organize olur. Aktin filamanlarının bir araya gelmesi ve ayrılması, paketler ve birbirleri ile ağ oluşturacak şekilde çapraz bağlantılar yapmaları ve diğer hücresel yapılar (plazma zarı gibi) ile etkileşimleri çok sayıda **aktin-bağlayan protein** tarafından düzenlenir. Bu proteinler, aktin hücre iskeletinin önemli elemanlarındandır (**Tablo 13.1**). Aktin filamanları özellikle plazma zarının hemen altında; mekanik destek sağlayacak, hücre şeklini belirleyecek ve hücrelerin yüzey hareketlerinin gerçekleştirmesine böylece hücrelerin göç etmesi, partikül alımı ve bölünmesine olanak sağlayacak bir ağ oluşturur.

Aktin filamanlarının yapılanması ve ayrışması

Aktin ilk olarak 1 yılında, toplam hücre proteinlerinin yaklaşık %20'sini oluşturduğu kas hücrelerinden izole edilmiştir. Başlangıçta aktinin yalnızca



Şekil 13.1 Aktin filamanları Aktin filamanlarına ait elektron mikrograf (Roger Craig'in izniyle, University of Massachusetts Medical Center)

kas kasılması ile ilişkili olduğu düşünülse de, günümüzde tüm ökaryot hücrelerinde en fazla miktarda bulunan protein (toplam proteinin %5-10'u) olduğu bilinmektedir. Mayalarda yalnızca bir aktin geni vardır, fakat yüksek ökaryotlarda aktin gen ailesinin farklı üyelerini kodlayan birçok farklı tipte aktin geni bulunur. Örneğin, memelilerde en az altı farklı aktin geni vardır: bunlardan dördü farklı kas tiplerinde eksprese edilirken (iskeletsel, kardiyak ve düz kas), ikisi kas dışındaki hücrelerde eksprese olur. Bununla birlikte aktinlerin tümünün amino asit dizilimleri birbirine benzerdir ve ökaryotlarda evrim süresince korunmuştur. Örneğin, maya aktini ile memeli hücrelerindeki aktinlerin amino asit dizilimleri %90 oranında aynıdır. Aktin-ilişkili proteinler bakterilerde de, hücre bölünmesine katılmak ve hücre şeklini belirlemek dahil olmak üzere önemli roller oynar.

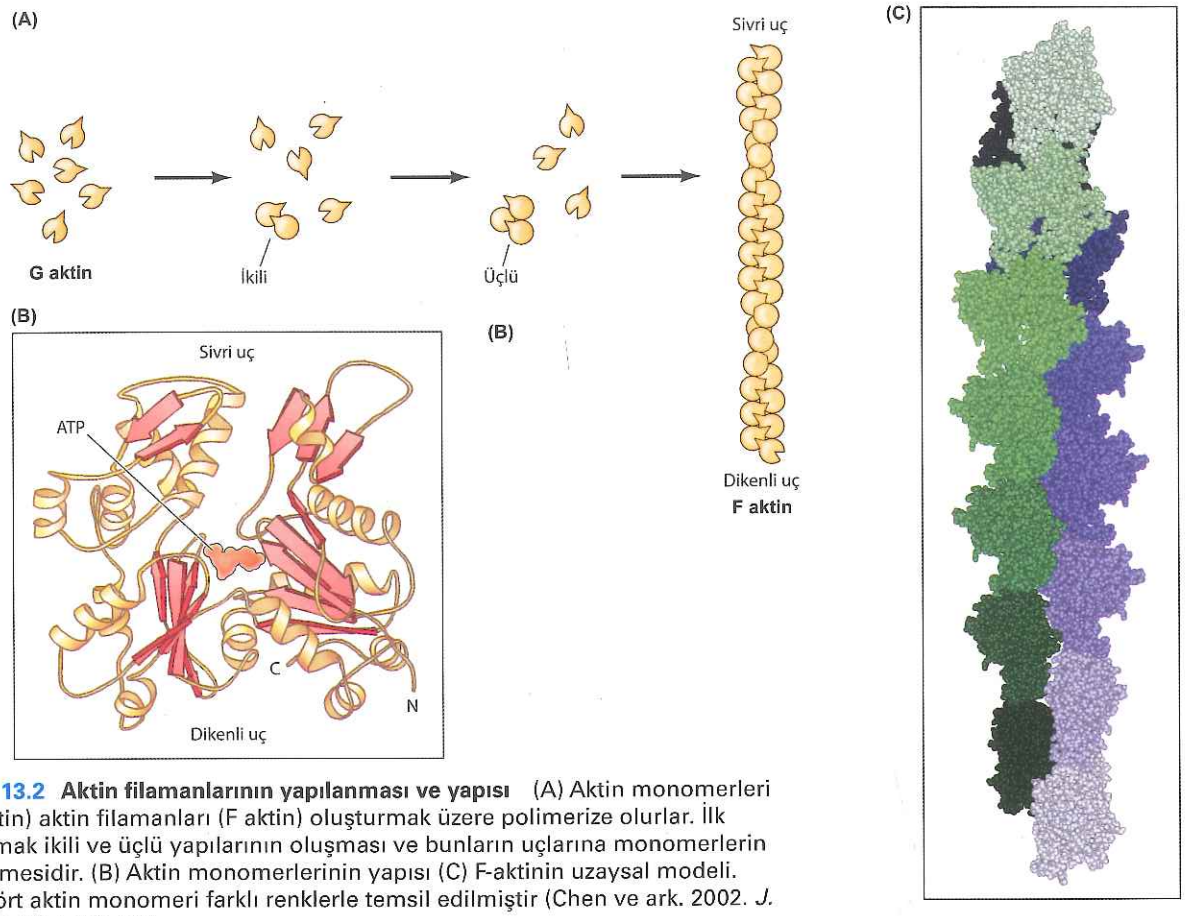
Hem aktin moleküllerinin, hem de aktin filamanlarının üç boyutlu yapısı 1990'da Kenneth Holmes, Wolfgang Kabsch ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir. Aktin molekülleri 375 amino asitlik (43 kd) globüler proteinlerdir. Her aktin monomerinin (**globüler [G] aktin**), iki aktin monomeri arasındaki baş-kuyruk etkileşimlerini düzenleyen sıkı bağlantı bölgeleri vardır, böylece aktin monomerleri filamalar şeklinde polimerize olur (**filamentöz [F] aktin**) (Şekil 13.2). Her monomer filaman içinde 166° döner, bu şekilde bir çift-iplikli sarmal görünümü oluşur. Bütün aktin monomerleri aynı yönde eklendikleri için, aktin filamanlarının iki ucunun yükleri farklıdır ve uçların (artı ve eksi uçlar olarak adlandırılır) birbirinden farkı ayırt edilebilir. Aktin filamanlarının bu polaritesi; hem yapılanmaları, hem de bu bölümde daha sonra da anlatılacağı gibi, miyozin hareketinin aktine göre tek bir yönde gerçekleşmesi için önemlidir.

Aktin monomerler ve filamanlar, aktinin kendi özelliğinden yararlanarak hücrelerin içinde sıkı bir şekilde kontrol edilirler. Fizyolojik koşullar altında, aktin monomerleri filamanlar oluşturmak üzere polimerize olurlar. Aktin polimerleşmesinin ilk basamağı (nükleasyon olarak adlandırılır) üç aktin monomeri içeren küçük bir birikim oluşumudur. Böylece monomerlerin her iki uçtan ters olarak eklenmesi ile aktin filamanları büyüyebilir, ancak uçlardan birisi (artı uç) eksi uca göre beş ila on kez daha hızlı uzar. Aktin monomerleri

Tablo 13.1 Aktine Bağlanan Proteinler

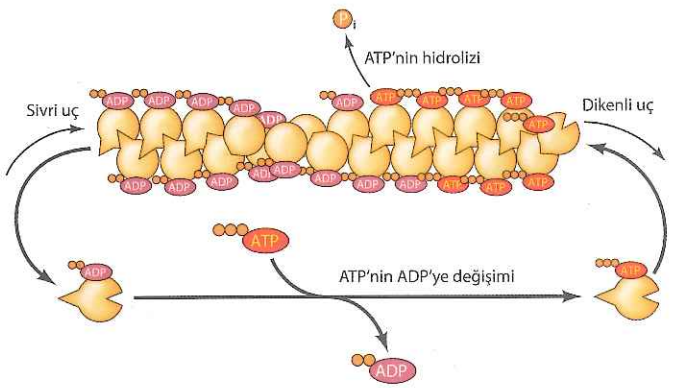
Hücresel rol	Temsilci proteinler
Monomer bağlanması	Profilin, twinfilin
Filaman oluşumunun başlaması ve polimerizasyonu	Arp2/3, formin
Ucun kapatılması	CapZ, tropomodulin
Filaman stabilizasyonu	Nebulin, tropomiyozin
Filaman çapraz bağlanması	α-aktinin, filamin, fimbrin, villin
Aktin filamanının diğer proteinlere bağlanması	Distrofin, spektrin, talin, vinkulin
Filaman koparılması/depolimerizasyonu	Kofilin, gelsolin

Animasyon 13.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a13.1
Aktin Filamanının Birleşmesi
Aktin monomerleri aktin filamanlarını oluşturmak üzere organize olur. Bu süreç tersine çevrilebilir ve hücrede aktin-bağlayan proteinler tarafından düzenlenir.



Şekil 13.2 Aktin filamanlarının yapılanması ve yapısı (A) Aktin monomerleri (G aktin) aktin filamanları (F aktin) oluşturmak üzere polimerize olurlar. İlk basamak ikili ve üçlü yapılarının oluşması ve bunların uçlarına monomerlerin eklenmesidir. (B) Aktin monomerlerinin yapısı (C) F-aktinin uzaysal modeli. On dört aktin monomeri farklı renklerle temsil edilmiştir (Chen ve ark. 2002. *J. Struct. Biol.* 138: 92).

aynı zamanda ATP'ye de bağlanır (Bkz. Şekil 13.2). ATP, filaman yapılanmasını takiben ADP'ye hidrolize olur. Polimerleşme sırasında enerji sağlamak için ATP gerekmemesine karşın, ATP bağlı aktin monomerleri ADP bağlı olanlara göre daha çabuk polimerleşir. Bunun bir sonucu olarak, ATP bağlı aktin monomerleri, filamanların eksi uçlarına hızlı bir şekilde ilave edilir ve ardından ATP polimerizasyon sonrasında ADP'ye hidrolize olur. ADP bağlı aktin daha gevşek bir şekilde bağlı olup artı uçtan ayrılabilir. Bu durum, ATP bağlı aktinin eksi uca eklenirken ADP bağlı aktinin artı uçtan ayrıldığı, **yürüme** (***treadmilling***) olarak bilinen bir fenomen ile sonuçlanabilir (Şekil 13.3). Yürüme, aşağıda tartışıldığı üzere, hücre içindeki aktin filamanların yapı ve işlevlerinin düzenlenmesinde kritik olan aktin filamanların dinamik davranışını açıklamaktadır.



Şekil 13.3 Yürüme ve ATP'nin aktin filaman polimerizasyonundaki rolü ATP'ye bağlı durumdaki aktin hızla büyümekte olan artı uçlara bağlanır ve daha sonra ATP filaman içinde ADP'ye hidrolize olur. ADP-aktin, ATP-aktine göre filamanlardan daha kolay ayrıştığından, ATP bağlı aktin monomerleri artı uca eklenirken ADP bağlı aktin monomerleri eksi uçtan ayrılır.

Bilgi İçin

Falloidin ölüm kap mantarı *Amanita phalloides*'den elde edilir. Bu mantar aynı zamanda özel bir RNA Polimeraz II inhibitörü olan α-amanitin de üretir. Ölüm kap mantarı ve benzer mantarlar tarafından üretilen toksinler karaciğere ve böbreğe saldırır ve tedavi edilmezse ölüme yol açabilir (Bkz. Bölüm 8).

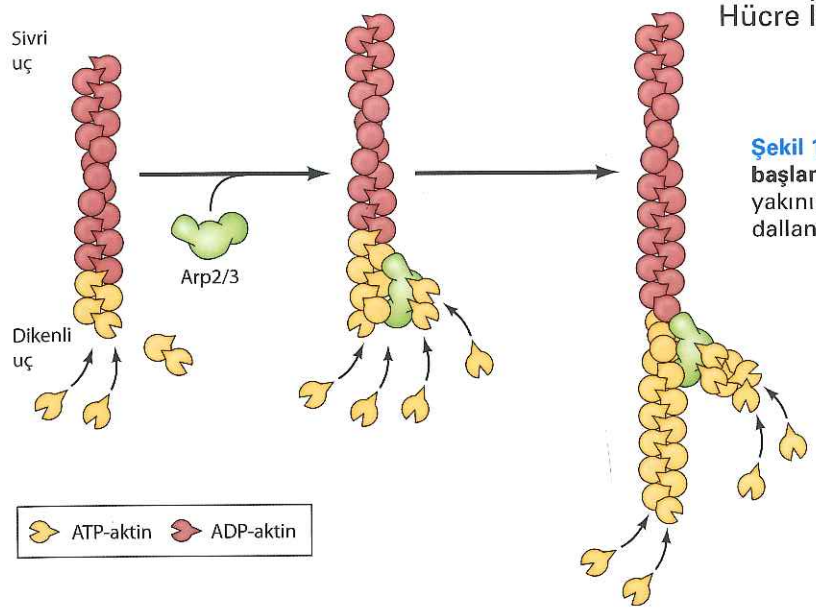
Hücre biyolojisinde yararlanılan birçok ilacın da aktine bağlanarak, aktin polimerleşmesini değiştirerek etki yapması dikkate değerdir. Örneğin, **sitokalasinler** aktin filamanlarının artı ucuna bağlanır ve uzamalarını durdurur. Bu, hücre şeklinin değişmesi kadar, bazı hücre tiplerinde hücre hareketlerinin (örn., mitozu izleyen hücre bölünmesi) engellenmesi ile sonuçlanır ve bu işlevler için aktin filamanlarının gerekli olduğunu gösterir. Bir diğer ilaç olan **falloidin,** aktin filamanlarına sıkıca bağlanarak, tek tek aktin moleküllerine ayrışmasını önler. Floresan mikroskop ile aktin filamanlarının görüntülenmesinde sıklıkla floresan bir boya ile işaretlenmiş falloidin kullanılır.

Hücre içinde, aktine-bağlanan proteinler aktin filamanlarının hem yapılanmasını, hem de ayrışmasını düzenler. Bu proteinlerden bazıları aktin filamanlarının oluşmasını başlatır ya da büyümelerini uyarır. Diğerleri aktin filamanlarına uzunlamasına bağlanarak ya da uçlarına başlık gibi takılarak ve aktin monomerlerinin ayrılmasını engelleyerek filamanları stabilize eder. Diğer taraftan bazı proteinler aktin filamanlarını keserek ve depolimerizasyonlarını uyararak ayrıştırır.

Aktin filaman oluşumunun başlatılmasını ve uzamasını uyaran başlıca proteinler **formin** ve **Arp2/3 kompleksi** (aktin-ilişkili protein) dir. Filamanların hücre içinde nerede oluşacaklarını belirlemek için bu proteinlerin faaliyetleri çeşitli sinyallere yanıt olarak düzenlenir. Forminler, ATP-aktin bağlayan ve aktin monomerlerin ilk polimerizasyonunu çekirdeklendiren bir protein ailesidir (**Şekil 13.4**). Bunlar daha sonra artı uca yeni monomerler ekleyerek büyüyen filaman boyunca hareket eder. Forminler, stres lifleri, kasılma halkası, filopodia ve (daha sonra bu bölümde tartışılacak olan) kas hücrelerinin ince filamanlarını oluşturan uzun dallanmamış aktin filamanlarını çekirdeklendirir. Forminler, aktin monomerleri bağlayan ve bağlı ADP'nin ATP ile değişimini teşvik eden **profilin** adlı başka bir aktin-bağlayan protein ile ilişkilidir. Bu ATP-aktin bölgesel konsantrasyonunu arttırarak aktin polimerizasyonunu teşvik eder.

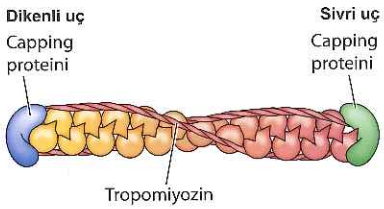
Arp2/3 proteinleri, plazma zarında hücre hareketinde itici bir güç olarak rol oynayan dallanmış aktin filamanlarının büyümesini başlatır (**Şekil 13.5**). Arp2/3 proteinleri filamanları ATP-aktinin artı uçlarına yakın bağlanır ve yeni bir dal oluşumunu başlatır. Arp2/3 proteinlerinin aktivitesi birkaç başka hücresel protein tarafından kontrol edilir ve böylece dallanmış aktin filamanlarının oluşumu hücrenin fizyolojik gereksinimlerine göre düzenlenmiş olur.

Şekil 13.4 Aktin filamanların formin ile başlatılması ve büyümesi Aktin filamanı oluşumunun hız sınırlayıcı aşaması nükleasyondur ve bu olay ilk üç aktin monomerinin, daha sonraki polimerizasyona imkan verebilmek için, doğru hizalanmasını gerektirir. Hücre içinde, aktin filamanlarının nükleasyonu, bir aktine-bağlanan protein olan formin tarafından kolaylaştırılır. Bir formin dimerinin her alt birimi bir aktin monomerine bağlanır. Aktin monomerleri, üçüncü monomerin bağlanmasını sağlayacak doğru konfigürasyonda tutulur, bunu forminin eksi ucu takip etmeye devam ettiği hızlı polimerizasyon izler. Forminler aktin monomerleri üzerindeki bağlı ADP ile ATP'nin değişimini uyaran profirin ile ilişkilidir.



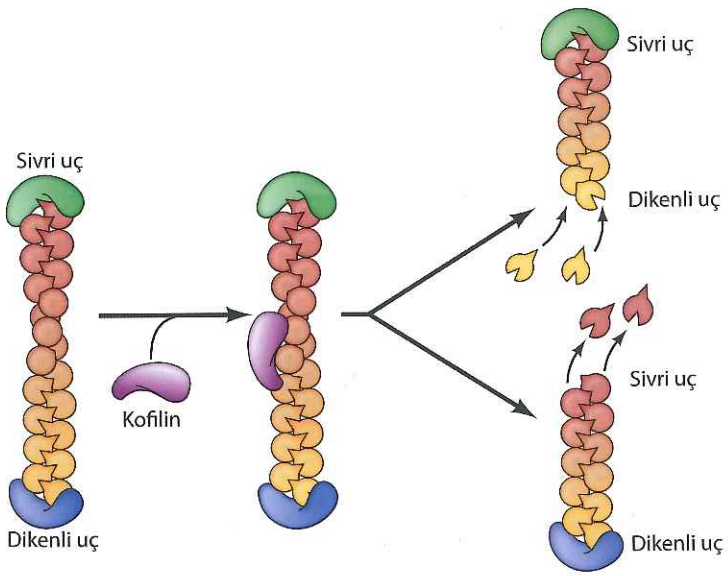
Şekil 13.5 Aktin filaman dallanmasının başlaması Arp2/3 kompleksi artı uçlarının yakınından aktin filamanlarına bağlanır ve dallanma yapılarının oluşumunu başlatır.

Birçok aktin filamanı, uçlarına ve **tropomiyozin** ailesinin üyeleri gibi filaman-sabitleyici proteinlere bağlanan başlık proteinleri nedeniyle hücre içerisinde nispeten stabildir. (Şekil 13.6). Tropomiyozinler 30-36 kd büyüklüğünde aktin filamanlarının oluşturduğu oluğa uzunlamasına bağlanan, fibröz proteinlerdir. Alternatif kırpılma nedeniyle dört tropomiyozin geni 40'ı aşkın sayıda farklı tropomiyozin proteini kodlar. Bu proteinler, aktin filamanlarının hücre içindeki yerlerinin belirlenmesinde temel belirleyicilerdir. Aktin filamanları boyunca bağlanan diğer proteinler, filamanları demetler veya ağlar şeklinde çapraz bağlamaya yarar ya da aktin filamanların diğer hücresel proteinlerle birleşmesine aracılık eder. Aktin-bağlayan bu proteinlerin bazı örnekleri bu bölümde daha sonra hücre fizyolojisindeki özelleşmiş rolleri açısından tartışılacaktır.



Şekil 13.6 Aktin filamanların kararlı hale getirilmesi Aktin filamanları artı ve eksi uçlarına bağlanan başlık proteinleri ve uzunlamasına bağlanan filaman-sabitleyici proteinler (örn., tropomiyozin) ile kararlı hale getirilir.

Diğer aktin-bağlayan proteinler mevcut filamanları sabitlemek yerine yeniden düzenler veya değiştirir. Buna bir örnek aktin filamanlarını kesen aktin-bağlayan protein **kofilindir** (Şekil 13.7). Bu, filamanlarda eksi uçlarından depolimerizasyona veya artı uçlarından yeni monomerlerin eklenmesine açık olan yeni uçlar yaratır.



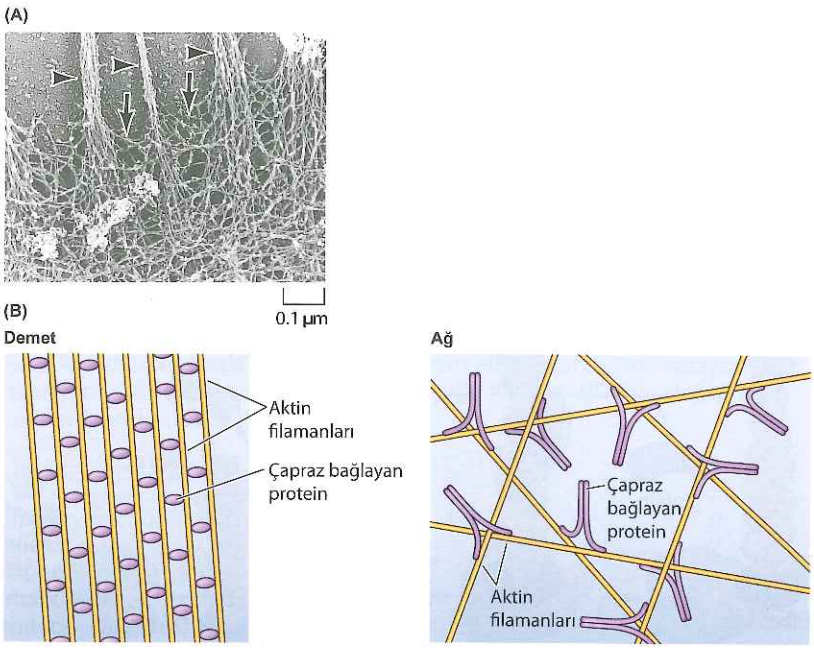
Şekil 13.7 Filamanların kofilin ile kesilmesi Kofilin aktin filamanlarına bağlanır ve onları keser. Böylelikle yeni oluşmuş filaman uçları aktin monomerlerinin polimerizasyonu ve depolimerizasyonu için elverişli hale gelir.

Tahmin edileceği gibi, bu proteinlerin aktivitesi, birçok sinyal ileti mekanizması ile kontrol edilir ve böylece çevresel uyarılara yanıt olarak, aktin polimerleşmesinin düzenlenmesi sağlanır. Böylece kofilin, profilin ve Arp 2/3 kompleksi (ve diğer aktin-bağlayan proteinler), aktin filamanlarının hızlı dönüşümünde ve aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde, birlikte etkili olurlar. Bu da, bu bölümde sonradan bahsedileceği üzere, çok çeşitli hücre hareketlerinin ve hücre şekil değişikliklerinin gerçekleşmesi için gereklidir. Mikrofilaman yapılanması ve ayrışması, bazı hücre tiplerinde hücredeki ATP hidrolizleri ve dönüşümlerinin yarısından sorumlu çok önemli bir süreçtir.

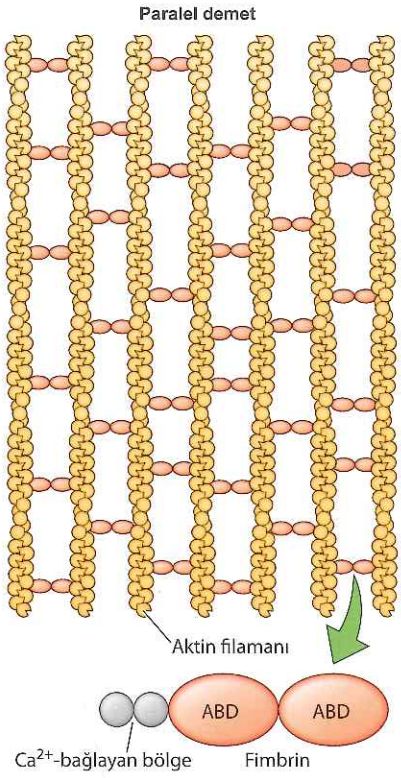
Aktin filamanlarının düzenlenmesi

Her bir aktin filamanı hücrede farklı roller oynayan, **aktin demetleri** ve **aktin ağı** olarak adlandırılan iki ana tipte yapılanmıştır (**Şekil 13.8**). Demetlerdeki aktin filamanları, sıkıca paketlenmiş paralel diziler halinde çapraz bağlantılar yapar. Ağlardaki aktin filamanları ise, yarı katı bir jel özelliğinde üç boyutlu bir tabaka oluşturacak ortogonal diziler halinde çapraz bağlantılar yapar. Daha önce bahsedildiği üzere, bu yapıların oluşumu aktin filamanlarına farklı şekillerde çapraz bağlantılar yapan çok sayıda aktin-bağlayan protein tarafından sağlanır (bkz.Tablo13.1).

Çapraz bağlantıya katılan aktin-bağlayan proteinlerin hepsinde aktine bağlanan en az iki bölge vardır. Bu bölgeler, onların aktine bağlanmalarını ve iki farklı aktin filamanı arasında çapraz bağlantı yapmalarını sağlar. Bu filamanlar arasındaki etkileşimlerin doğası çapraz bağlayıcı proteinlerin boyut ve şekilleri ile belirlenir (bkz. Şekil 13.8). Demetlerdeki aktin filamanlarına çapraz bağlanan proteinler (**aktin-demetleyici proteinler**), genellikle filamanları birbirlerine yakınlaşmaya zorlayan küçük katı proteinlerdir. Aktin filamanlarının ağlar şeklinde oluşumunu düzenleyen proteinler ise bunun aksine, dikey filamanlarla çapraz bağlantılar yapabilen büyük esnek proteinlerdir.



Şekil 13.8 Aktin demetleri ve ağı (A) Makrofaj plazma zarının altında yer alan aktin ağından (oklar) çıkan aktin demetlerinin (okbaşları) elektron mikrografı. Bu demetler filopod adı verilen hücre yüzey çıkıntılarını destekler (bkz. Şekil 13.19). (B) Demet ve ağların şematik düzenlenmesi. Demet yapılarındaki aktin filamanları, filamanları birbirlerine yakın olacak şekilde dizen küçük proteinler aracılığıyla paralel dizinler halinde çapraz bağlıdır. Bunun aksine, ağlar ortogonal filamanları çapraz bağlayan büyük esnek proteinler tarafından oluşturulur. (A, John H. Hartwig'in izniyle, Brigham & Women's Hospital)

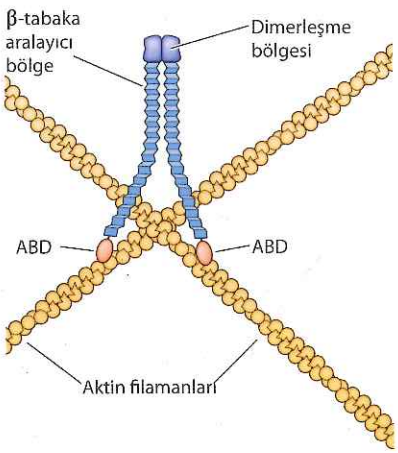


Şekil 13.9 Aktin demetleyici proteinler Aktin filamanlar, farklı aktin demet proteinleri ile iki demet tipi oluşturur. Fimbrin, yan yana yerleşik olan iki aktin bağlama bölgesine (ABD) sahiptir ve aktin filamanlarını, paralel demetler halinde ve birbirleriyle yaklaşık 14 nm mesafede olacak şekilde çapraz bağlar. Bunun aksine, α-aktinin yapısındaki iki aktin bağlama bölgesi birbiri ile mesafelidir ve filamanlar aralarında 40 nm olacak şekilde daha gevşek kasılabilir demetler halinde çapraz bağlar. Hem fibrin hem α-aktinin iki adet Ca^{2+}-bağlama bölgesi içerir ve α-aktinin, dört adet tekrarlayan α-sarmal aralayıcı bölgeye sahiptir.

Farklı aktin-demetleyici proteinlere gereksinim duyan, fonksiyonel ve yapısal olarak farklı, iki aktin demeti tipi vardır (Şekil 13.9). Bu demetlerden birinci tip, paralel yerleşimli, yakın aralıklı aktin filamanlarını (**paralel demetler**) içerir ve plazma zarındaki mikrovilus gibi çıkıntılara destek olur (bkz. Şekil 13.17 ve 13.18). Bu demetlerdeki bütün filamanlar aynı yüktedir ve artı uçları plazma zarına bitişiktir. Bu yapının oluşumuna katılan demetleyici proteinlere bir örnek olarak **fimbrin** verilebilir. Fimbrin ilk olarak barsak mikroviluslarından izole edilmiştir ve daha sonra birçok farklı hücre tipinin yüzey çıkıntılarında saptanmıştır. Fimbrin, iki komşu aktin-bağlayan bölgesi olan 68 kd luk bir proteindir. Aktin filamanlarına monomer olarak bağlanır ve iki paralel filamanı birbirine yaklaştırır.

Aktin demetlerinin ikinci tipi daha geniş aralıklı filamanlardan oluşmuştur. Bu demetlerin (**kasılan demetler** olarak adlandırılır) daha açık yapısı çapraz bağlayıcı proteini ***α*-aktininin** özelliklerini yansıtır. Fimbrinin aksine α-aktinin aktine dimer olarak bağlanır, 102 kd'luk bir protein olan her bir alt birimin tek bir aktin-bağlanma bölgesi vardır. Bu nedenle, α-aktinin ile çapraz bağlantı yapan filamanlar arasında, fimbrin ile bağlananlardan çok daha büyük mesafe vardır (14 nm yerine 40 nm uzaklık). Filamanlar arasındaki boşluğun artması motor protein miyozinin bu demet içindeki aktinler ile etkileşime girmesine izin verir, bu da demetlerin kasılmasını sağlar (daha sonra anlatılacağı gibi).

Ağdaki aktin filamanları, **filamin** gibi büyük aktin-bağlayan proteinler ile bir arada tutulur (Şekil 13.10). Filamin aktine 280 kd'luk iki alt birimden oluşan bir dimer olarak bağlanır. Aktin-bağlanan bölgeleri ve dimerleşme



Şekil 13.10 Aktin ağları ve filamin Filamin, aktin filamanlarını ortogonal ağa çapraz bağlayan V şeklinde esnek bir molekül (mavi) oluşturan iki büyük alt birime (280 kd) sahip bir dimerdir. Karboksi ucu dimerleşme bölgesi, tekrarlayan *β*-tabaka aralayıcı bölgeler aracılığıyla amino ucundaki aktin bağlanma bölgesinden (ABD) ayrılmıştır.

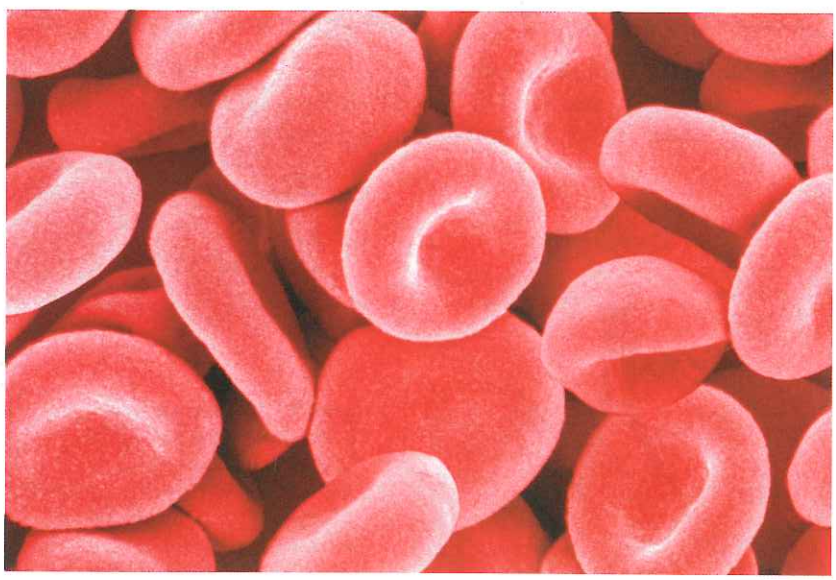
bölgeleri her bir alt birimin zıt uçlarındadır, bundan dolayı filamin dimeri, her bir kolunun ucunda aktin bağlama bölgesi olan esnek V şeklinde bir moleküldür. Sonuç olarak, filamin gevşek üç boyutlu bir tabaka yaratarak, ortogonal aktin filamanları arasında çapraz bağlantılar oluşturur. Gelecek bölümde de anlatılacağı gibi, bu gibi aktin filaman ağları, plazma zarının temelini oluşturur ve hücre yüzeyine destek olur.

Aktin filamanlarının plazma zarı ile etkileşimleri

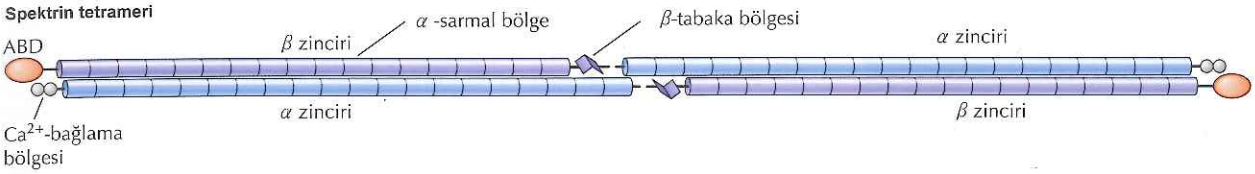
Aktin filamanları, hücrenin çevresinde, yani plazma zarının altında üç boyutlu bir ağ oluşturduğu yerde çok yoğundur (bkz. Şekil 13.8). Bu aktin filamanları ağı ve ilişkili aktin-bağlayan proteinler (**hücre korteksi** olarak adlandırılır) hücre şeklini belirler ve hareketi de içeren çok sayıda hücre yüzeyi aktivitesi ile ilişkilidir. Bu nedenle, aktin hücre iskeleti ile plazma zarı arasındaki bu bağlantı hücre yapı ve fonksiyonunda çok önemlidir.

Kırmızı kan hücreleri (eritrositler) özellikle plazma zarı (bir sonraki bölümde anlatılacak) ve kortikal hücre iskeleti çalışmaları için çok yararlı bilgiler sağlamaktadır. Kırmızı kan hücrelerinin en önemli avantajı, bunların çekirdek ve diğer hücre içi organellerinin olmamasıdır ve bu nedenle kırmızı kan hücrelerinin plazma zarları ve bağlandığı proteinler, diğer hücre tiplerinde oldukça fazla miktarda bulunan hücre içi zarlar ile kontamine olmadan kolayca elde edilebilir. Ek olarak, insan eritrositlerinin diğer hücre iskeleti elemanları da (mikrotübüller ve ara filamanlar gibi) yoktur, bu yüzden kortikal hücre iskeleti bu hücrelerin bikonkav disk şeklinin asıl belirleyicisidir (**Şekil 13.11**).

Eritrositlerin kortikal iskeletinin yapısal temelini oluşturan ana protein aktin-bağlayan protein **spektrindir** (**Şekil 13.12**). Spektrin büyük bir aktin-bağlayan proteinler ailesi olan kalponin ailesinin bir üyesidir; α-aktinin, filamin

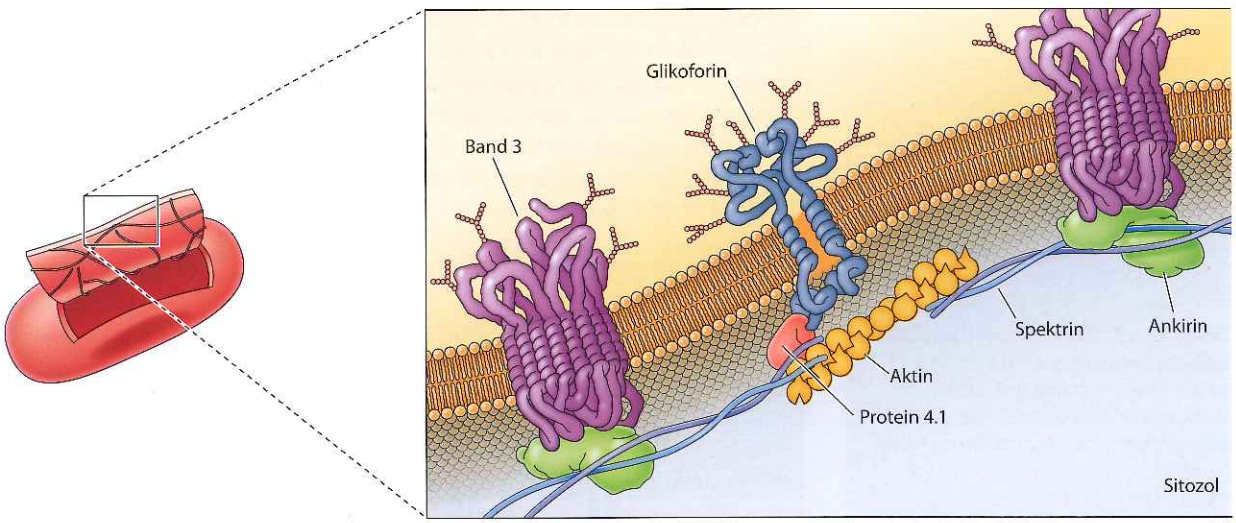


Şekil 13.11 Kırmızı kan hücrelerinin morfolojisi Alyuvarların tarayıcı elektron mikrografı tarafından görüntülenen hücrelerin bikonkav yapısı. Yapay renk eklenmiştir.

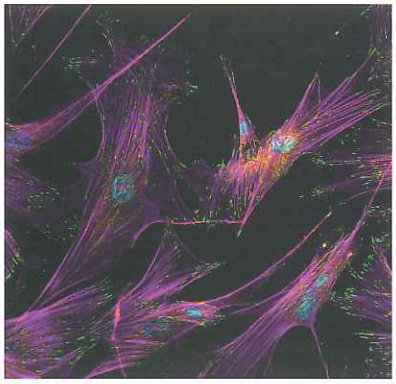


Şekil 13.12 Spektrin yapısı Spektrin iki α ve β zincirine sahip tetramer yapıda bir moleküldür. Her bir β zinciri amino ucunda tek bir aktin bağlama bölgesine (ADB) sahiptir, α ve β zincirleri, tetramerdeki iki aktin bağlama bölgesini ayıran, çok sayıda α sarmal aralayıcı bölge tekrarlarına sahiptir, α zincir ise karboksi ucunda iki Ca^{2+} -bağlama bölgesi içermektedir.

ve fimbrin de bu ailedendir. Tüm spektrinler, α ve β olarak adlandırılan ve moleküler ağırlıkları sırasıyla 240 ve 220 kd olan, iki farklı polipeptid zinciri içeren tetramerlerdir. α ve β zincirinin amino ucunda bir aktin bağlama bölgesi vardır, α ve β zincirleri yan yana bağlanarak dimerler oluşturur. Daha sonra baş bölgelerinin karşılıklı olarak birbirlerine bağlanması ile tetramerler oluşur ve iki aktin-bağlayan bölüm birbirinden yaklaşık 200 nm uzaklaşır. Böylece spektrin tetramerinin iki ucu kısa aktin filamanları ile bağlanabilir, bu da, kırmızı kan hücrelerinin kortikal hücre iskeletini şekillendirecek olan spektrin-aktin ağının oluşumu ile sonuçlanır (**Şekil 13.13**). Spektrin her ne kadar plazma zarındaki fosfolipidlere kendisi bağlansa da, spektrin aktin ağı ve plazma zarı arasındaki ana bağlantı **ankirin** olarak adlandırılan ve hem spektrine hem de sık rastlanan transmembran bir protein olan band 3 proteininin sitoplazmik bölümüne bağlanan bir protein ile sağlanır. Spektrin-aktin ağı ve plazma zarı arasındaki bir diğer bağlantı da protein 4.1 ile gerçekleşir. Protein 4.1 spektrin-aktin kavşağına bağlandığı gibi, glikoforinin (bir diğer sık rastlanan transmembran protein) sitoplazmik bölgesine de bağlanır.



Şekil 13.13 Eritrosit kortikal hücre iskeletinin plazma zarı ile bağlantısı Plazma zarı spektrin tetramer ağı ile bağlantılıdır. Spektrin tetramerleri kısa aktin filamanlarıyla çağraz bağlı haldedir. Spektrin-aktin ağı plazma zarına, hem spektrinlere hem de ortamda bol miktarda bulunan transmembran protein band 3'e bağlanan ankirin ile bağlıdır. Bir ek bağlantı da, protein 4.1'in glikoforine (bir başka bol miktarda bulunan transmembran proteini) bağlanması ile sağlanır.

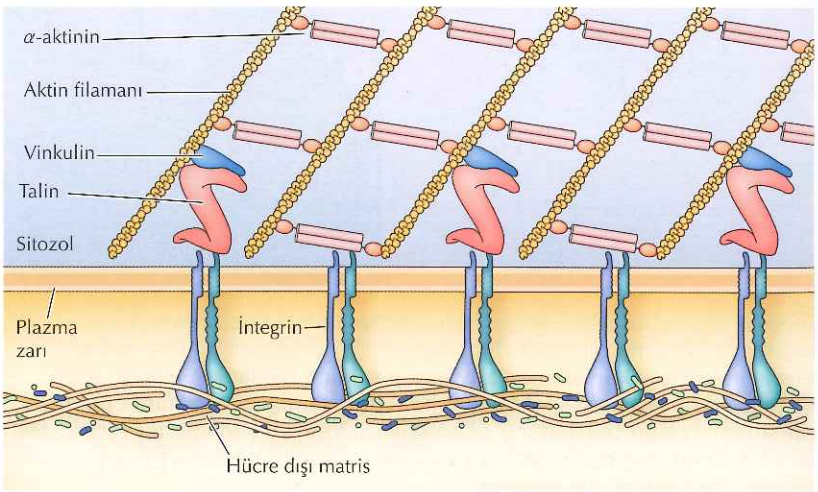


Şekil 13.14 Stres lifleri ve fokal adhezyonlar Fibroblastların floresan mikroskopisi. Aktin filamanları macenta fokal adhezyonlar ise vinkuline karşı bir antikor ile parlak yeşil olarak boyanmıştır.

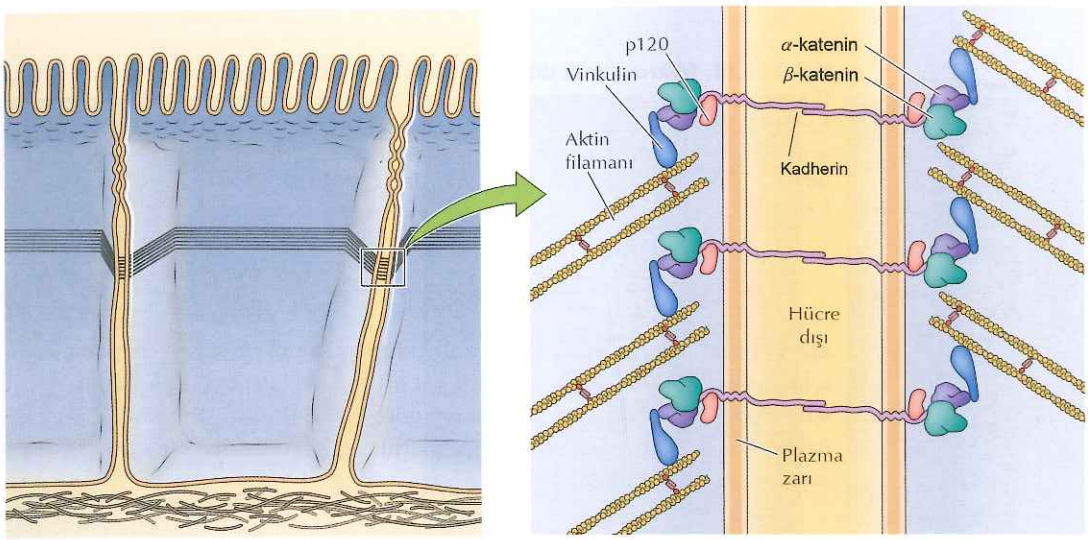
Diğer hücre tiplerinde de, kortikal hücre iskeleti ve plazma zarı arasında kırmızı kan hücrelerinde gözlenenlere benzer bağlantılar vardır. Spektrin ile ilişkili proteinler, ankrin ve 4.1 proteini çok çeşitli hücre tiplerinde eritrositlerde tanımlananlara benzer fonksiyonlar görür. Örneğin kalponin protein ailesinin bir diğer üyesi olan **distrofin**, iki tip kas distrofisinden (Duchenne ve Becker) sorumlu gen ürünü olduğu için özel bir ilgi görmektedir. Bu X'e bağlı kalıtsal hastalıklar, iskelet kasında ilerleyen dejenerasyon ile sonuçlanmakta, hastalığın şiddetli formlarında hastalar (Duchenne kas distrofisi) onlu yaşlarda veya yirmili yaşların başlarında ölmektedir. Bu hastalıktan sorumlu genin moleküler klonlanması, genin kodladığı bir büyük proteinin (427 kd) Duchenne kas distrofili hastalarda bulunmadığını, Becker kas distrofili hastalarda ise anormal olduğunu göstermiştir. Distrofinin dizilenmesi onu bir aktin-bağlayan protein olarak belirlemiştir. Spektrin gibi, distrofin de kas hücresi plazma zarındaki transmembran proteinler ile aktin filamanları arasındaki bağlantıyı oluşturur. Bu transmembran proteinler de karşılık olarak, kas kasılması sırasındaki hücre kararlılığında önemli rol oynayan ekstraselüler matrisi hücre iskeletine bağlar.

Kırmızı kan hücrelerindeki tek tip yüzeylerin aksine, çoğu hücrenin plazma zarında, komşu hücrelere veya ekstraselüler matrise (Bölüm 15'te anlatılacak) teması sağlayan özelleşmiş bölgeler vardır. Bu bölgeler aynı zamanda, hücre iskeletini hücre dokunma alanlarına bağlayan aktin filaman demetleri için tutunma bölgesi olarak işlev görür. Aktin filamanlarının bu bağlantıları özellikle de hücre kültürlerinde üretilen fibroblastlarda apaçık görülebilmektedir (**Şekil 13.14**). Bu gibi kültürdeki fibroblastlar kültür kabının yüzeyine yapışan ekstraselüler matris proteinleri salgılarlar. Daha sonra, fibroblastlar kültür kabına, ekstraselüler matrise bağlanan transmembran proteinleri (**integrin** olarak adlandırılan) aracılığı ile tutunurlar. Bu tutunma bölgeleri **stres lifleri** denilen büyük aktin filaman demetleri için tutunma bölgesi olarak da görev yapan belirli alanlar (**fokal adhezyonlar** denilen) oluşturur.

Stres lifleri α-aktinin ile çapraz bağlanmış ve tropomiyozin ile dengelenmiş kasılabilir aktin filaman demetleridir, hücreyi bağladığı yüzeye karşı gerilim yaratır. Plazma zarına integrinler ile etkileşim yoluyla fokal adhezyonlardan tutunur. Bu karmaşık bağlantılar, **talin** ve **vinkulin** gibi birçok diğer protein ile düzenlenir (**Şekil 13.15**). Örneğin, hem talin hem de α-aktinin integrinlerin sitoplazmik bölgelerine bağlanır. Talin aynı zamanda, daha sonra aktin ile



Şekil 13.15 Stres liflerinin fokal adhezyonlarda plazma zarına tutunması Fokal adhezyonlar, integrinlerin ekstraselüler matrise bağlanması ile oluşur. Stres lifleri (α-aktinin ile çapraz bağlı olan aklin filaman demetleri) ise çeşitli proteinleri kapsayan karmaşık etkileşimler üzerinden integrinlerin sitoplazmik bölgeleri ile bağlantı kurar. Olası iki bağlantı şematize edilmiştir: (1)Talin, integrine ve vinkuline bağlanır, hem talin hem de vinkulin aktine bağlanır ve (2) integrin α-aktinine bağlanır.



Şekil 13.16 Aktin filamanlarının adherens bağlantılara tutunması Adherens bağlantılardaki hücre-hücre etkileşimleri, aktin demetlerinin bağlanma bölgeleri olan kadherinler aracılığıyla gerçekleşir. Epitelyal hücre tabakalarında, bu bağlantılar her bir hücrenin çevresinde sürekli bir aktin filaman kemeri oluşturur. Transmembran kadherinler, β-katenine ve p120'ye bağlanarak bağlantının stabilizasyonunu düzenler. β-katenin ayrıca α-katenine bağlanıp, vinkulin ile etkileşerek aktin filamanların adherens bağlantılar ile bağlantısını gerçekleştirir.

Bilgi İçin

Adherens bağlantılardaki rolüne ek olarak β-katenin, Wnt sinyal iletim yolağının da önemli bir bileşenidir ve burada transkripsiyonel aktivatör olarak rol oynar (Bkz. Bölüm 16).

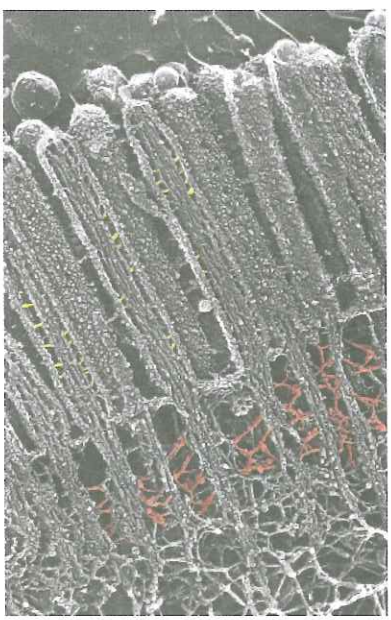
etkileşime girecek olan vinkuline de bağlanır. Fokal adhezyonlarda bulunan diğer proteinler aktin filamanlarının tutunmasına katkı sağlar ve bu etkileşimlerin bileşimi aktin filamanları ile plazma zarı arasındaki bağlantıdan sorumludur.

Aktin hücre iskeleti **adherens bağlantı** olarak adlandırılan, hücre- hücre temas bölgelerine de benzer şekilde tutunur (Şekil 13.16). Epitel hücre tabakalarında bu bağlantılar her hücrenin etrafında kesintisiz kemer benzeri yapı (**adhezyon kemeri** olarak adlandırılır) oluşturur. Bu yapı altındaki kasılabilir aktin filamanları demeti, plazma zarı ile bağlantılıdır. Adherens bağlantılardaki hücreler arasında etkileşim, **kadherinler** olarak adlandırılan ve Bölüm 15'te anlatılacak olan, transmembran proteinler ile düzenlenir. Kadherinler, vinkulin ve diğer aktin-bağlayan proteinler ile etkileşerek aktin filamanları plazma zarına bağlayan **kateninler** olarak adlandırılan sitoplazmik proteinler ile kompleks oluştururlar.

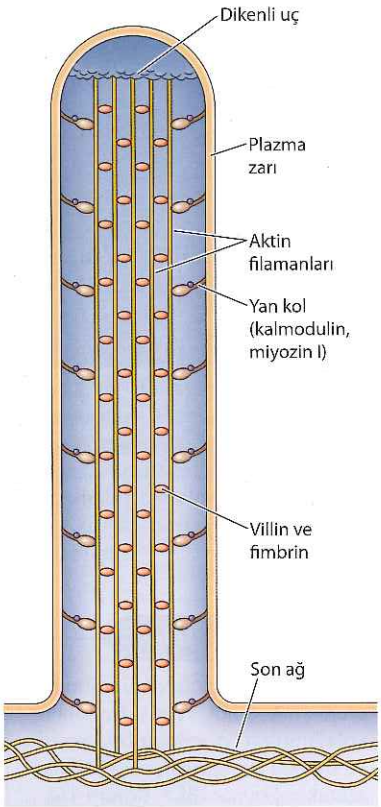
Mikroviluslar

Çoğu hücrenin yüzeyinde hücre hareketi, fagositoz ve besinlerin emilimi gibi özelleşmiş fonksiyonlar ile ilişkili birçok çıkıntı ve uzantılar vardır. Bu hücre yüzey uzantılarının çoğu aktin filamanlarından temel alır, ya kısmen kalıcı ya da hızla yeniden düzenlenen demet veya ağlar ile organize edilir.

Aktin temelli hücre yüzey çıkıntılarından en iyi tanımlanmış olanı **mikroviluslardır**. Bunlar özellikle barsağı döşeyen epitel hücreleri gibi, emilim ile görevli hücrelerin yüzeylerinde fazla miktarda bulunan, plazma zarının parmak benzeri uzantılarıdır (Şekil 13.17). Bu hücrelerdeki mikroviluslar,



Şekil 13.17 Mikrovilusların elektron mikroskobu fotoğrafı Barsak epitel hücrelerindeki mikroviluslar plazma zarındaki parmak benzeri çıkıntılardır. Ucu, ağ olarak tanımlanan korteksin yoğun bölgelerine tutunan aktin demetleri tarafından desteklenirler. (Nobutaka Hirokawa'nın izniyle.)



Şekil 13.18 Mikrovillinin düzenlenmesi Mikrovilli yapısındaki aktin filamanları, villin ve fimbrin tarafından paketlenmiş demetler halinde çapraz bağlıdır. Bu filamanlar kalmoduline bağlı halde miyozin I içeren yan kollar aracılığıyla, plazma zarına boydan boya tutunur. Aktin filamanlarının artı uçları mikrovilusun ucunda proteinlerden oluşan bir kepin içine gömülü haldedir.

apikal yüzey üzerinde hücre başına yaklaşık bin mikrovilus içeren ve emilim için uygun yüzey alanını 10 ile 20 kat artıran bir tabaka (**fırça kenar** olarak adlandırılan) oluşturur. Emilimdeki görevlerinin yanı sıra mikrovilusların özelleşmiş bir tipi, işitsel tüy hücrelerindeki **stereosiller**, ses titreşimlerini saptayarak işitmeden sorumludur.

Fazla miktarda bulunmaları ve izole edilmelerindeki kolaylık, sıkıca paketlenmiş 20-30 aktin filamanın oluşturduğu paralel demetleri içeren barsak mikroviluslarının ayrıntılı yapısal analizini kolaylaştırmıştır (Şekil 13.18). Bu demetlerdeki filamanlar, kısmen birçok farklı hücre tipinin yüzey çıkıntılarında bulunan, aktin-demetleyen bir protein olan (daha önce anlatılmıştı, bkz. Şekil 13.9) fimbrin tarafından çapraz bağlanır. Bununla birlikte barsak mikroviluslarındaki ana aktin-demetleyen protein, barsağı ve böbrek tübüllerini döşeyen hücreler gibi birkaç özelleşmiş hücre tipindeki mikroviluslarda bulunan 95 kd'luk bir protein olan **villin**dir. Mikroviluslardaki aktin demetleri boylu boyunca miyozin I ile bağlanmış kalsiyum bağlayıcı protein kalmodulini içeren yan kollar tarafından plazma zarına tutunmuştur. Burada miyozin I plazma zarının mikroviluslardaki aktin demetleriyle birlikte hareketi ile ilişkili olabilir. Taban bölümünde aktin demetleri, aktin korteksinin son ağ olarak adlandırılan, spektrince zengin bölgesine tutunmuştur; bu yapı mikrovilusları çapraz bağlar ve sabitler.

Video 13.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v13.1
Lamellipodlar Lamellipodlar fibroblastların ön ucunda yer alan tabaka şeklinde uzantılardır.

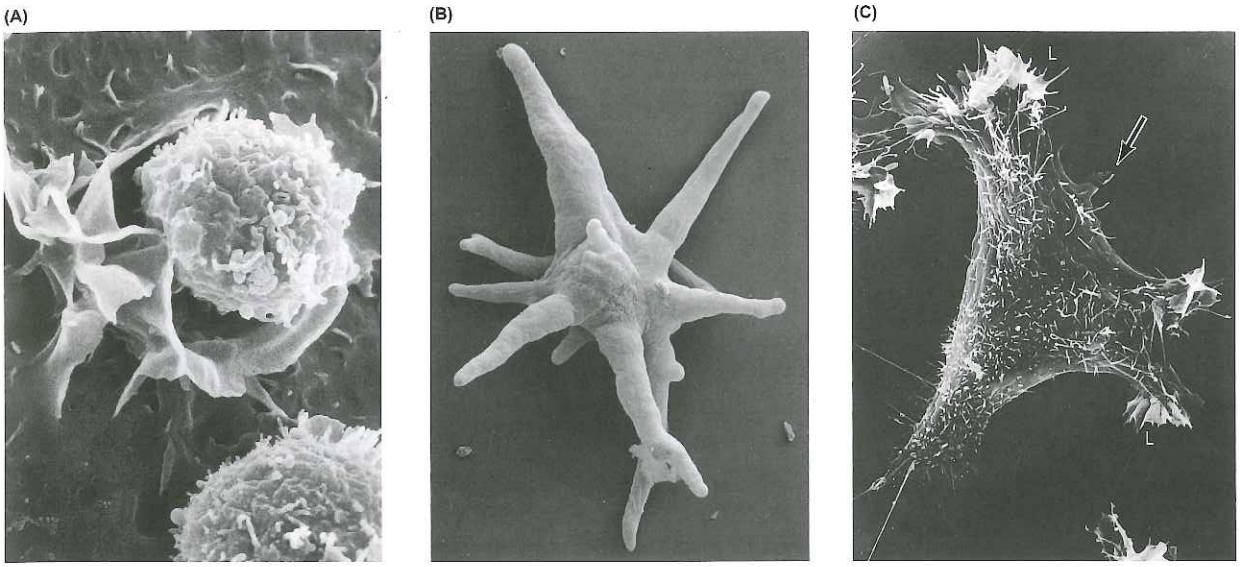
Hücre yüzey çıkıntıları ve hücre hareketi

Mikrovilusların aksine birçok yüzey çıkıntısı çevresel uyarılara yanıt olarak oluşan ve hücre hareketinde yer alan geçici yapılardır. Hücrenin bir yüzeyde ilerlemesi, basit tipte bir hücre hareketidir ve çok sayıda farklı hücre tarafından kullanılır. Örnek olarak, amiplerin sürünme hareketi, gelişim sırasında embriyo hücrelerinin göçü, enfeksiyonlarla savaş sırasında beyaz kan hücrelerinin dokulara invazyonu, yara iyileşmesine katılan hücrelerin göçü ve malin tümörlerin metastazı sırasında kanser hücrelerinin yayılması verilebilir. Benzer hareket tipleri fagositozdan ve sinir sistemi gelişimi sırasında sinir hücresi çıkıntılarının uzamasından da sorumludur.

Bu hareketlerin tamamı, hareket eden bir hücrenin öncü ucundan uzanan plazma zarının yerel uzantılarına dayanmaktadır (Şekil 13.19). **Psödopodlar** üç-boyutlu ağ şeklinde çapraz bağlanmış aktin filamanlarından oluşan orta genişlikte uzantılardır, fagositoz ve amiplerin bir yüzeyde hareket etmesinden sorumludur. **Lamellipodlar**, fibroblastların öncü ucunda bulunan geniş, levha benzeri uzantılardır ve benzer şekilde aktin filaman ağı içerirler. **Filopodlar**, lamellipodlardan büyüyen plazma zarının aktin demetleri ile desteklenmiş ince uzantılarıdır. Hücre hareketi esnasında bu yapıların oluşumu ve geri çekilmesi aktin filamanlarının yapılanması ve ayrışması ile düzenlenir.

Bilgi İçin

Bazı patojen bakteriler (örn., *Listeria*), konuk hücre sitoplazmasında hareket edebilmek ve komşu hücreleri enfekte etmek için aktin hücre iskeletinin normal dinamiğini yıkar.

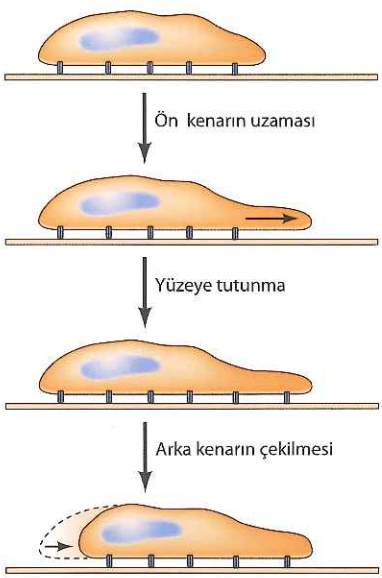


Şekil 13.19 Fagositoz ve hücre hareketinde yer alan hücre yüzey çıkıntısı örnekleri (A) Fagositoz sırasında bir tümör hücresini içine çekmekte olan bir makrofajın yalancı ayaklarını (psödopod) gösteren tarayıcı elektron mikrografı (B) Uzamış birkaç yalancı ayak içeren bir amip (C) Ön ucunda lamellipodu (L) ve filopodu (ok) gösteren doku kültür hücresi.

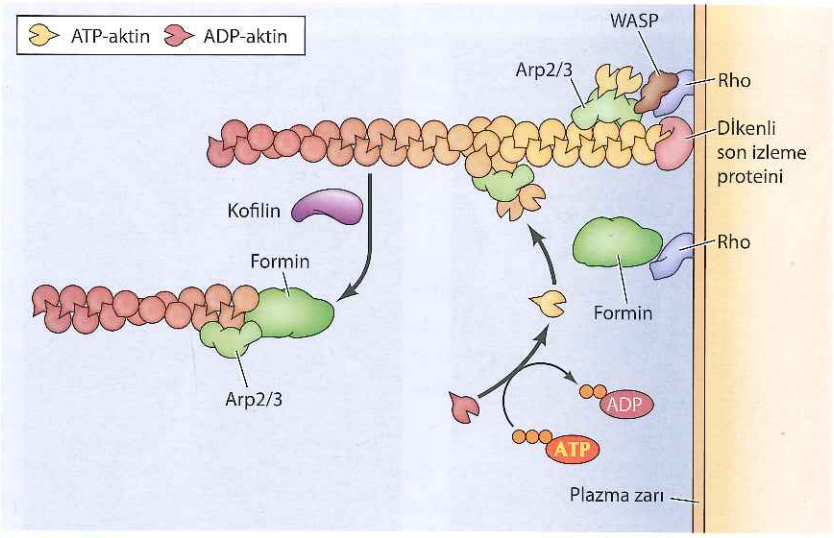
Video 13.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v13.2
Hücre Hareketi Bir yüzey boyunca hücre hareketi ön ucun uzaması, tutunma ve çekilmeyi içerir.

Hücre hareketi veya uzun hücresel çıkıntıların uzaması birkaç aşamada incelenebilecek koordine bir hareketler döngüsüdür (**Şekil 13.20**). İlk olarak, hücrenin öncü kenarından psödopod, lamellipod ya da filopod gibi çıkıntılar uzamalıdır. Çoğu hücrenin ilk hareketlerine, daha sonradan lamellipodlara katılacak olan filopodların uzaması aracılık eder. Bu uzantılar daha sonra hücrenin göç edeceği yüzeye tutunmalıdır. Son olarak, hücrenin arka kenarı yüzeyden ayrılmalı ve hücre gövdesine doğru geri çekilmelidir. Öncü kenarın uzaması için aktin filamanlarının dallanmasının ve polimerleşmesinin gerekli olduğunu gösteren birçok deney vardır. Örneğin, aktin polimerleşmesinin engellenmesi (örn., sitokalasin uygulanması ile) hücre yüzey çıkıntılarının oluşmasını bloklamaktadır. Aşağıda tanımlandığı üzere, hücre çıkıntılarının uzamasının altında yatan süreç öncü kenarda plazma zarına karşı aktin filaman polimerizasyonunun kuvvetidir. Çoğu zaman hücreler diğer hücrelerden ya da çevreden gelen sinyallere yanıt olarak hareket ederler.

Örneğin yara iyileşmesinde, kesik kenarındaki hücreler yarayı kaplamak için ekstraselüler matris boyunca hareket eder. Hücre yüzeyinde dışarıdan gelen uyarılara yanıt olarak çıkıntılar oluşması, **Rho** ailesinin Ras proteinlerine benzeyen küçük GTP-bağlayıcı proteinleri (Cdc42, Rho ve Rac) tarafından düzenlenir ve bu olay Bölüm 16'da tartışılacaktır.



Şekil 13.20 Hücre göçü Hücrelerin bir yüzey üzerinde hareketi aşamalı gerçekleşen koordine hareketler olarak görülebilir: (1) Ön ucun uzaması, (2) ön ucun yüzeye tutunması ve (3) hücrenin arkasının hücre gövdesine doğru çekilmesi.



Şekil 13.21 Aktin filamanların ön uçta yeniden düzenlenmesi Rho ailesi üyeleri WASP, Arp2/3 ve formini aktive ederek dallanmış aktin filamanlarının başlatılmasına ve uzamasına yol açar. Profilin ADP-aktin monomerlerini, ADP/ATP değişimi yoluyla aktive ederek filaman uzamasını teşvik eder. Mevcut filamanların kofilin tarafından kesilmesi yeni artı uçların başlamasını ve yeni filamanların büyümesini sağlar.

Video 13.3
sites.sinauer.com/cooper7e/v13.3
Aktin Filamanı ile Uyarılmış Hareket Hücre hareketi sırasında lamellipodların oluşumu aktin filamanlarının birleşmesine ve ayrılmasına dayanır.

Hücre hareketini uyaran sinyaller reseptörleri aktive ederek aktin polimerizasyonunu teşvik etmekte görevli olan Rho ailesi üyelerinin aktivasyonuna yol açar (Şekil 13.21). Rho ailesi üyeleri **WASP** ailesi proteinlerini aktive eder ve bu da Arp 2/3 kompleksini uyararak dallanmış aktin filamanlarının büyümesini başlatır. Rho ailesi üyeleri ayrıca forminleri aktive eder ve forminler Arp2/3 kompleksi tarafından başlatılan dallanmış filamanları uzatmanın yanı sıra lineer filamanları da başlatır. Kofilin aynı zamanda mevcut filamanları ayırarak ve filaman dallanmasını ve büyümesini desteklemek için yeni artı uçlar sağlayarak aktin ağının yeniden biçimlenmesinde önemli bir rol oynar. Büyüyen aktin filamanlar plazma zarına doğru itme oluşturur ve hücre yüzey çıkıntılarının oluşmasını sağlar. Profilin tarafından oluşturulan ATP-aktinin yüksek lokal konsantrasyonlarında, aktin filamanların artı uçlarındaki büyüme enerjik olarak tercih edilir ve önemli ölçüde kuvvet üretebilir. Tek bir filaman hücre zarını uzatmak için yeterli kuvveti uygulayamaz iken birçok filaman bunu kolayca yapabilir.

Yeni aktin filamanları (yeniden düzenlenmiş mikrotübüller ile birlikte) büyüyen hücre uzantısının içine doğru uzadıkça, yeni mikrofilamanlar, genişlemenin devam etmesi için gerekli lipid ve protein içeren veziküllerin taşınması için gerekli yolakları oluşturur. Hücrelerin yüzeye tutunması için hücre-yüzey adhezyonunun yeniden yapılanması gereklidir. Epitel hücreleri ya da fibroblastlar gibi yavaş hareket eden hücrelerde, tutunma için fokal adhezyonların oluşması gerekir (bkz. Şekil 13.15). Amipler veya beyaz kan hücreleri gibi daha hızlı hareket eden hücreler ise, yüzey ile moleküler içeriği henüz bilinmeyen daha yoğun temas oluştururlar.

Aktin filamanları ve mikrotübüller tarafından büyüyen hücre uzantısına taşınan kargo proteinlerinin arasında, kalponin ailesi proteinler, talin ve vinkulin gibi fokal adhezyon proteinlerinin yanında, aktin demetlerinin ve stres liflerinin oluşması için gerekli aktin-demetleyici proteinler bulunmaktadır (Şekil 13.15'te örneklendiği gibi). Vinkulin ve talin, plazma zarı lipidleri ile kurulan bağlantı ile aktive edilir. Bunlar ekstraselüler matrise bağlanmak için integrinleri aktive eder ve integrinleri aktin filamanlarına bağlar. Fokal adhezyonların gelişimi aynı zamanda stres liflerinin oluşumunu gerektirir (bkz. Şekil 13.14) ve bu formin ve miyozin II'nin aktivasyonunun sonucunda Rho tarafından uyarılır (bu bölümün sonraki kısmında tartışılacaktır).

Hücre göçünde son basamak, Arf ve Rho ailelerinin küçük GTP-bağlayan proteinlerinin etkisi ile gerçekleşen (bkz. Bölüm 11) arka kenarın geri çekilmesidir. Bu olay mevcut fokal adhezyonların bozulmasını düzenler ve hücrenin arka kenarındaki plazma zarının endositozunu uyarır. Daha sonra hücrenin ön ucundaki yeni fokal adhezyonlarla bağlantılı stres lifleri hücrenin arka ucunu ileriye çeker.

Miyozin Motorları

Genellikle miyozin ile bağlantılı olan aktin filamanları, hücre hareketlerinin birçok tipinden sorumludur. **Moleküler motor** ön modeli olan **miyozin**, ATP formundaki kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye dönüştüren, böylece güç ve hareket meydana getiren bir proteindir. Bu gibi hareketlere en iyi örnek, aktin-miyozin etkileşimlerini ve miyozin molekülünün motor aktivitesini anlamak için bir model oluşturan kas kasılmasıdır. Ancak, aktin miyozin etkileşimleri yalnızca kas kasılmasından değil, kas dışındaki hücrelerin hücre bölünmesi ve hücre içi vezikül ve organel taşınması dahil çok çeşitli hareketlerinin gerçekleşmesinden de sorumludur. Bu nedenle, aktin miyozin etkileşimleri hücre biyolojisinde çok önemli role sahiptir.

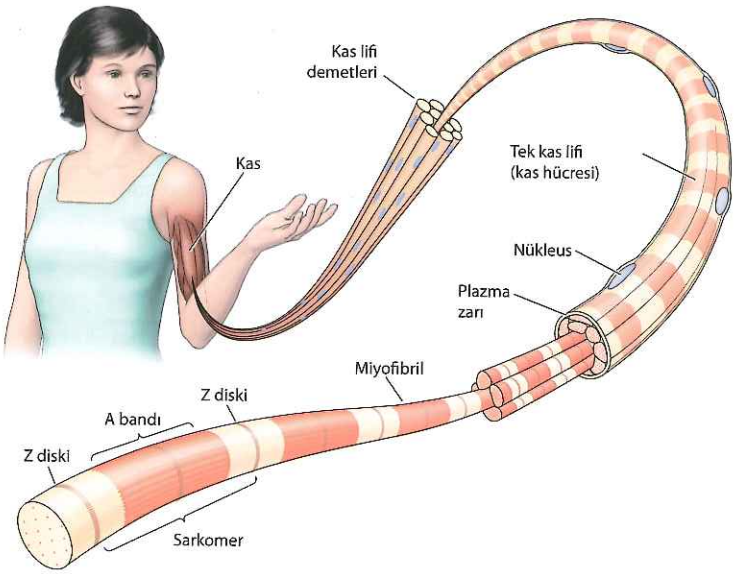
Kas kasılması

Kas hücreleri tek bir görev için özelleşmiş hücrelerdir: kasılma. Yapı ve fonksiyonlardaki bu özelleşme kası, hücre hareketlerini hücresel ve moleküler düzeyde çalışmak için çok iyi bir model yapmaktadır. Omurgalılarda üç farklı kas hücresi tipi vardır: bütün istemli hareketlerden sorunlu iskelet kası, kalpten kan pompalayan kalp kası ve mide, barsak, uterus ve kan damarları gibi organların istemsiz hareketlerinden sorumlu olan düz kas. Hem iskelet hem de kalp kasında kasılmayı sağlayan elemanlar, enine-çizgili tipik bir görüntü verecek şekilde çok iyi düzenlenmiş diziler halinde bulunur. İskelet kasındaki bu yapıların tanımlanması, kas kasılmasının ve miyozin temelli hücre hareketlerinin günümüzde moleküler düzeyde anlaşılmasına yol açmıştır.

İskelet kasları, gelişim sırasında birçok hücrenin birleşmesi ile yapılanan, tek tek büyük hücrelerden (yaklaşık 50 μm çapında ve birkaç santimetreye kadar uzunlukta) oluşmuş **kas lifi demetleri**dir (Şekil 13.22). Sitoplazmalarının büyük bölümünü iki tip filamanın, kalın miyozin filamanları (yaklaşık 15 nm çapında) ve ince aktin filamanları (yaklaşık 7 nm çapında) oluşturduğu silindirik demetler halindeki **miyofibriller** kaplar. Her miyofibril, **sarkomerler** olarak adlandırılan kasılabilir birimler zinciri olarak yapılanmıştır. Bu yapı iskelet ve kalp kasındaki çizgili görüntüden sorumludur.

Bilgi İçin

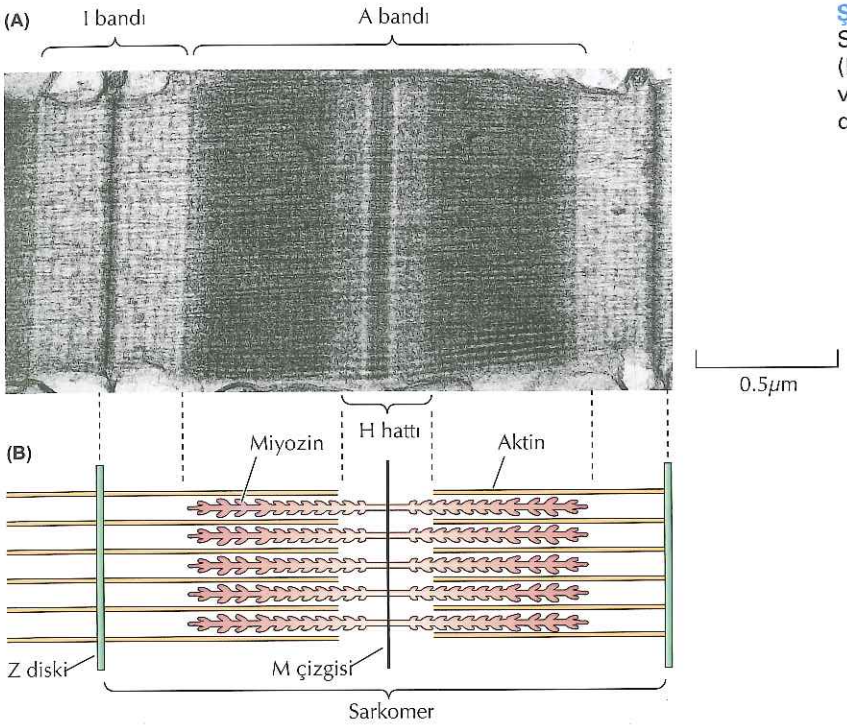
Düz kas hücrelerinin aktivitesini düzenleyen moleküller önemli ilaçlardır. Örneğin albuterol, düz kasları gevşeten bir ilaç olup astım tedavisinde ve gebe kadınlarda prematüre doğumu engellemede kullanılır. Bunun aksine oksitosin, düz kasları kasan bir hormondur ve doğumu uyarmak için uygulanır.



Şekil 13.22 Kas hücrelerinin yapısı Kaslar, kas lifleri olarak tanımlanan, tek büyük hücrelerin demetlerinden oluşur. Bu hücreler hücre füzyonu ile oluşur ve çok sayıda nükleus içerir. Her bir kas lifi, aktin ve miyozin filaman demetlerine sahip çok sayıda miyofibril yapılar içerir. Bu aktin ve miyozin filamanları ise sarkomer adı verilen ve Z disklerine bağlanan, tekrarlayan birimlerin bulunduğu zincir şeklindeki yapılardır.

Sarkomerler (yaklaşık 2.3 μm uzunluğunda), birçok farklı bölge içerir. Bu bölgeler, kas kasılmasının mekanizmasının aydınlanmasına önemli katkı sağlayan elektron mikroskop ile ayırt edilebilir (Şekil 13.23). Her sarkomerin ucu Z diski olarak tanımlanır. Her bir sarkomerde koyu bandlar (polarize ışıkta anizotrop göründüğü için A bandı olarak adlandırılmıştır) ve açık bantlar (izotrop olduğu için I bandı olarak adlandırılmıştır) sıra ile yerleşmiştir. Bu bantlar miyozin filamanlarının varlığını ya da yokluğunu gösterir. I bandlarında yalnızca ince aktin filamanları bulunurken, A bantlarında kalın miyozin içeren filamanlar vardır. Miyozin ve aktin filamanları A bandının kenardaki bölümünde üst üste gelirken orta bölgede (H hattı denilen) yalnızca miyozin bulunur. Aktin filamanları artı uçları ile çapraz bağlayıcı protein olan α-aktinini içeren, Z diskine bağlanmış, miyozin filamanları ise sarkomerin ortasındaki M çizgisine tutunmuştur.

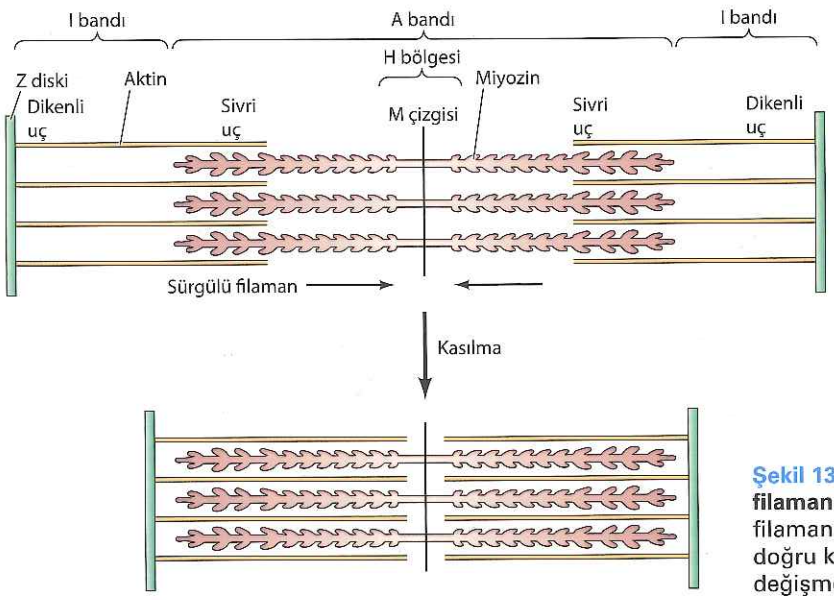
Kas kasılmasının anlaşılmasının temelini **kayan filaman modeli** oluşturur. Bu model ilk kez 1954'de, hem Andrew Huxley ve Ralph Niedergerke, hem de Hugh Huxley ve Jean Hanson tarafından önerilmiştir (Şekil 13.24). Kas kasılması sırasında, her sarkomer, Z disklerini birbirine daha yakın hale getirerek kısalır. A bandının genişliği değişmez, fakat her iki I bandı ve H hattı hemen tamamen kaybolur. Bu değişiklikler aktin ve miyozin filamanlarının birbirlerinine doğru kayması ile açıklanır, yani aktin filamanları A bandına



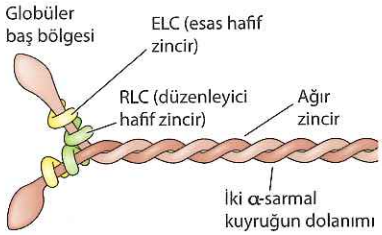
Şekil 13.23 Sarkomer yapısı (A) Sarkomere ait elektron mikrografı. (B) Belirtilen bölgelerde aktin (ince) ve miyozin (kalın) filamanlarının düzenlenmesini gösteren diyagram.

ve H bölgesine gider. Böylece kas kasılması aktin ve miyozin filamanları arasında göreceli olarak, birinin diğerine doğru hareket etmesi ile gerçekleşen bir etkileşim ile sonuçlanır. Bu etkileşimin moleküler temeli, miyozinin aktin filamanlarına bağlanarak, filamanların kaymasını yönlendiren bir motor görevi yapmasıdır.

Kasta bulunan miyozin tipi (**miyozin II**), iki özdeş ağır zincir (her biri yaklaşık 200 kd) ve iki çift hafif zincir (her biri yaklaşık 20 kd) içeren çok



Şekil 13.24 Kas kasılmasının kayan filaman modeli Aktin filamanları miyozin filamanlarını geçerek sarkomerin ortasına doğru kayar. Sonuçta filaman uzunluğu değişmeksizin sarkomer kısalır.



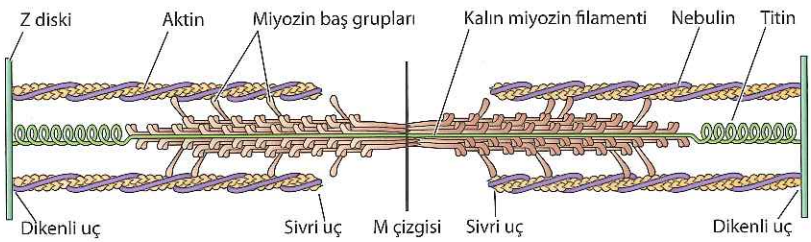
Şekil 13.25 Miyozin II Miyozin II molekülleri, iki ağır zincir ve iki çift hafif zincir (esas ve düzenleyici hafif zincirler olarak tanımlanır) içerir. Ağır zincirler globüler baş bölgelerine ve dimer yapısı oluşturmak üzere birbiri etrafına dolanan uzun α-sarmal kuyruklara sahiptir.

büyük bir proteindir (yaklaşık 500 kd) (Şekil 13.25). Her ağır zincir, globüler bir baş bölgesi ve uzun bir α-sarmal kuyruk içerir. İki ağır zincirin α-sarmal kuyrukları birbirleri etrafında dönerek bir dimer oluşturmak üzere dönen sarmal şeklinde kıvrılır ve iki hafif zincirin baş bölgesindeki boyun kısmından bağlanmaları ile tam bir miyozin II molekülü oluşur.

Kastaki kalın filamanlar, kuyrukları arasındaki etkileşimler ile paralel ve çakışmayacak şekilde kaymış bir dizi halinde bir araya gelmiş yüzlerce miyozin molekülü içerir (Şekil 13.26). Miyozinin globüler baş kısmı kalın ve ince filamanlar arasında köprü oluşturacak şekilde aktine bağlanır. Kalın filamanlardaki miyozin moleküllerinin, sarkomerin M çizgisinde zıt yönelimli olması önemlidir. Aktin filamanlarının polaritesi (artı uçlarından Z diskine tutunmuşlardır) de benzer olarak M çizgisinde zıt yönelimdedir, böylece aktin ve miyozin filamanlarının göreli yönlenimleri sarkomerin her iki yarısında da aynıdır. Kasılma, miyozinin baş gruplarının aktin filamanları boyunca artı uca doğru hareketinden kaynaklanır. Bu hareket aktin filamanlarını sarkomerin iki tarafından M çizgisine doğru kaydırır, sarkomeri kısaltır ve kas kasılması ile sonuçlanır.

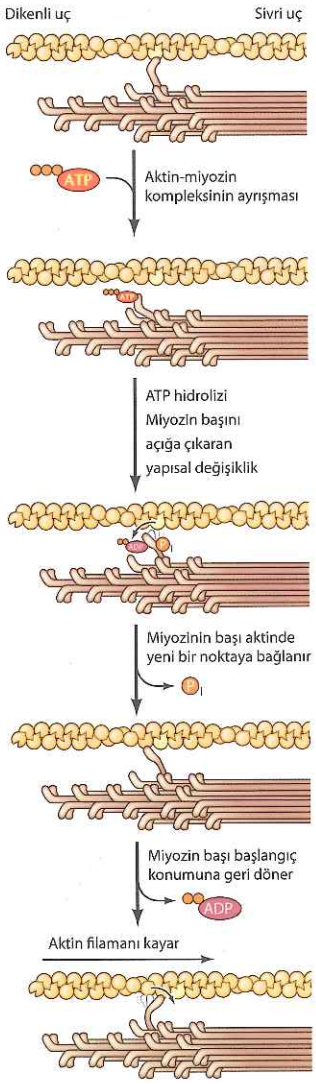
Miyozinin bir moleküler motor olarak aktivitesi, hareketi gerçekleştiren enerjiyi sağlamak için ATP'ye bağlanıp hidrolize eden miyozin baş grupları tarafından sağlanır. Kimyasal enerjiden harekete bu dönüşüm, ATP bağlanması sonucunda miyozinin şeklindeki değişiklikler tarafından düzenlenir. ATP hidrolizi miyozin başları ve aktin arasındaki bağlantıların döngüler halinde tekrarlanmasını sağlar. Her döngü sırasında, miyozindeki konformasyonel değişiklikler miyozin başlarının aktin filamanları boyunca hareket etmesi ile sonuçlanır.

Miyozin fonksiyonu için bir moleküler model, aktin filamanları boyunca miyozin hareketlerini belirleyen *in vitro* çalışmalardan ve miyozinin üç boyutlu yapısının tanımlanmasından köken almıştır (Şekil 13.27). Döngü, miyozinin (ATP olmadığında) aktine sıkıca bağlanması ile başlar. ATP bağlanınca, miyozin-aktin kompleksi ayrışır ve daha sonra ATP hidrolizi miyozinin şekilsel değişikliğine neden olur. Bu değişiklik miyozinin hafif zincirlerine bağlanan boyun bölgesini etkiler (bkz. Şekil 13.25) ve miyozin başlarının yerini yaklaşık 5 nm kadar değiştiren kaldıraç kolu gibi iş görür. Hidroliz ürünleri (ADP ve P_i)



Şekil 13.26 Aktin ve miyozin filamanların düzenlenmesi Kalın filamanlar, birkaç yüz miyozin II molekülünün bir dizin halinde birleşmesi sonucu oluşur. Miyozinin globüler başları aktini bağlar ve miyozin ve aktin filamanları arasında çapraz köprüler meydana getirir. Hem aktin hem de miyozin filamanlarının yerleşimi M çizgisinde tersine döner, bu nedenle göreli polaritesi sarkomerin her iki tarafında da aynıdır. Titin adı verilen büyük bir proteinin molekülleri Z diskinden M çizgisine dek uzanır ve miyozin filamanları sarkomerin merkezinde tutmak için ileri sıçrar. Bir başka proteinin (nebulin) molekülleri aktin ile birleşerek Z diskinden uzar ve aktin filamanları düzenlemeye ve kararlı hale getirmeye yarar.

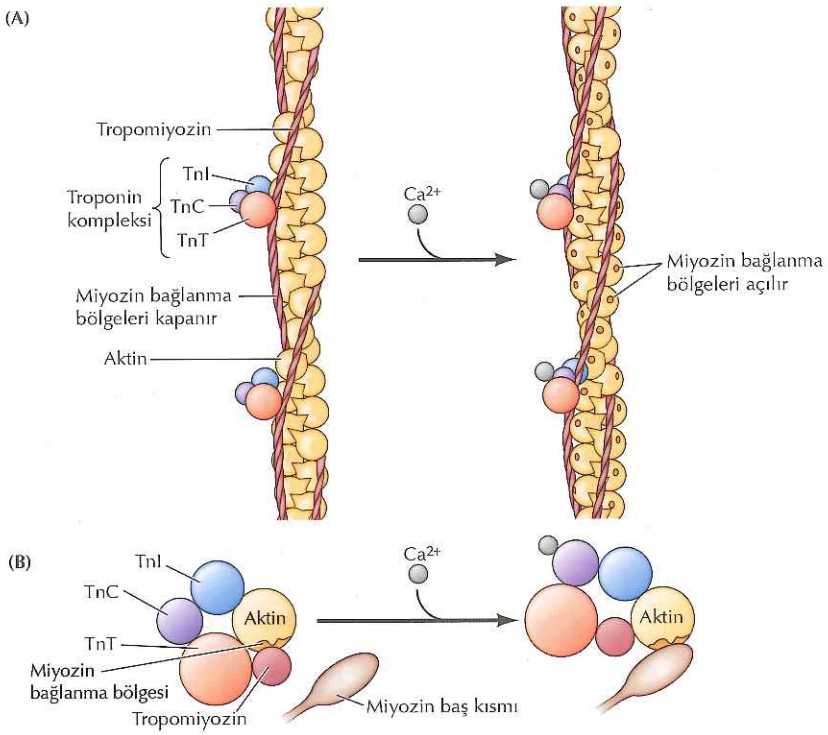
Animasyon 13.2
sites.sinauer.com/cooper7e/a13.2
İnce Filaman İskelet kasının ince filamanları tropomiyozin ve troponin kompleksi ile bezenmiş olup miyozin bağlanma bölgelerini çevreler.



Şekil 13.27 Miyozin davranış modeli ATP'nin bağlanması miyozini aktinden ayırır. ATP'nin hidrolizi, miyozin baş grubun yer değiştirmesini sağlayan konformasyonel bir değişikliğe neden olur. Bunu, miyozin başının aktin filamanı üzerinde yeni bir pozisyona bağlanması ve P_i'nin salınımı takip eder. Miyozin başının ADP'nin salınmasına yol açan orijinal konformasyonuna dönmesi, aktin filamanının kaymasını sağlar.

miyozin başına bağlı kalır, buna "kurulmuş" pozisyon da denilebilir. Bu durumda miyozin başları aktin filamanı üzerine yeni bir yerleşimden yeniden bağlanır, bu bağlanma sonucunda P_i serbest kalır. Bunun sonucunda ve "güç dalgası" nın tetiklenmesi ile ADP serbest kalır ve miyozin başları başlangıçtaki şekline döner, böylece aktin filamanları sarkomerin M çizgisine doğru kayar.

İskelet kasının kasılması sinirsel uyarı ile tetiklenir, bu da yüksek konsantrasyondaki Ca^{2+} iyonlarını depolayan ve özelleşmiş bir iç zarlar ağı (endoplazmik retikuluma benzeyen) olan **sarkoplazmik retikulumdan** Ca^{2+} salınmasını uyarır. Sarkoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımı, sitozoldeki Ca^{2+} konsantrasyonunu yaklaşık 10^{-7} ile 10^{-5} arasında artırır. Artmış Ca^{2+} konsantrasyonu, aktin filamanlarına bağlı iki protein olan tropomiyozin ve **troponin** üzerinden kas kasılmasını sinyaller (Şekil 13.28).



Şekil 13.28 Tropomiyozin ve troponinlerin aktin filamanları ile bağlantısı (A) Tropomiyozin aktin filamanları ile uzunlamasına bağlanır ve çizgili kasta üç adet troponin (troponin I, TnI; troponin C, TnC; troponin T, TnT) içeren bir komplekse bağlıdır. Ca^{2+}'un yokluğunda tropomiyozin-troponin kompleksi miyozinin aktine bağlanmasını engeller. Ca^{2+}'un TnC' ye bağlanması kompleksi değiştirir, inhibisyon ortadan kalkar ve kasılmanın ilerlemesini sağlar. (B) Enine kesitsel görünüm.

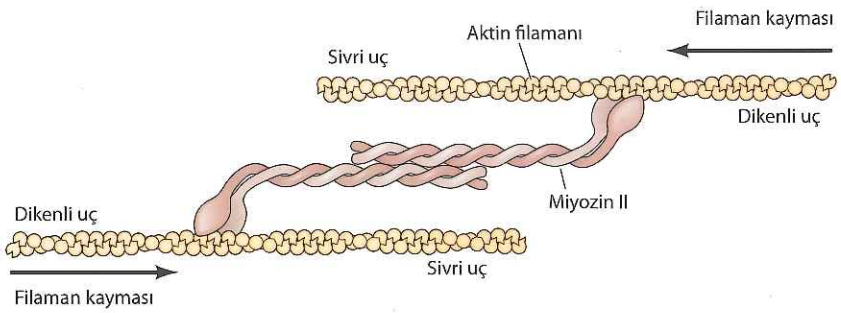
Çizgili kasta, her tropomiyozin molekülü troponine bağlıdır ve üç polipeptid ile kompleks oluşturur: troponin I (inhibitör) troponin C (Ca^{2+}- bağlayan) ve troponin T (tropomiyozin-bağlayan). Ca^{2+} konsantrasyonu düşük olduğu zaman, troponin-tropomiyozin kompleksi hemen tüm aktinlerin miyozin baş grupları ile olan bağlantısını bloklar, böylece kas kasılmaz. Yüksek konsantrasyonda iken, troponin C ye Ca^{2+} bağlanması kompleksin konumunu değiştirir, miyozin baş gruplarının artan sayıda aktine erişimine izin verir ve kasılmanın gerçekleşmesini sağlar.

Aktin ve miyozinin kas dışı hücrelerde kasılabilir yapılanmaları

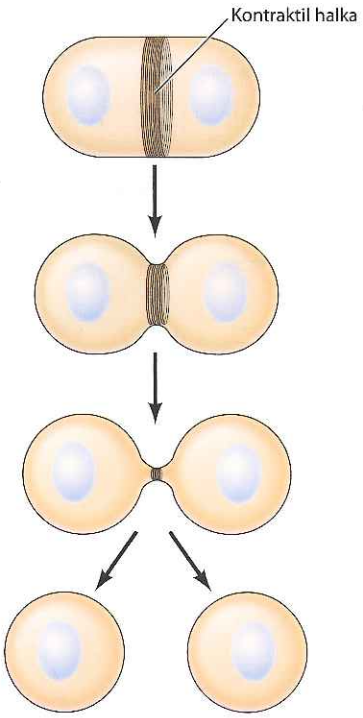
Aktin ve miyozinin kas liflerinin küçük-ölçekli bir tipi gibi kasılabilir birlikteliği, kas dışındaki hücrelerde de bulunmaktadır. Kas hücrelerindeki gibi, bu kasılabilir yapılanmada da aktin filamanları, 15-20 miyozin II molekülünden oluşan bipolar miyozin II filamanları ile bir araya getirilir, aktin filamanlarının birbirlerine doğru kayması ile kasılma meydana gelir (Şekil 13.29). Çizgili kaslardaki aktin filamanlarının aksine kas dışı hücrelerdeki aktin/miyozin filamanları sarkomerler halinde organize olmamıştır.

Kas dışı hücrelerin kasılabilir yapılanmalarının iki örneği stres lifleri ve adhezyon kemerleridir. Bu konu daha önce bu bölümde, hücre-yüzey ve hücre-hücre temaslarındaki aktin hücre iskeleti bağlantıları anlatılırken tartışılmıştı (bkz. Şekil 13.15 ve 13.16). Stres liflerinin kasılması, hücrede tutunduğu bir yüzeyi (örn., ekstraselüler matris) üzerine çekmesini sağlayan bir gerilim oluşturur. Adhezyon kemerlerinin kasılması epitel hücre tabakasının şeklini değiştirir: bu olay embriyo gelişimi sırasında, özellikle epitel hücre tabakalarının tüp gibi yapılar oluşturacak şekilde katlanmasında önemlidir.

Kas dışı hücrelerde aktin-miyozin kasılmasına en iyi örnek **sitokinez,** mitoz sonrasında bir hücrenin ikiye bölünmesi ile sağlanır (Şekil 13.30). Mayada ve hayvan hücrelerinde mitozun sonlarına doğru plazma zarının hemen altında, aktin filamanları ve miyozin II içeren bir **kasılabilir-halka** oluşur. Bunun kasılması plazma zarını kademeli olarak içeriye doğru çeker, hücrenin ortası giderek daha fazla daralır ve hücreyi ikiye ayırır. Kasılabilir-halkanın kalınlığının kasılmalar sırasında sabit kalması, aktin filamanların kasılma ilerledikçe dağıldığının bir işaretidir. Halka daha sonra hücre bölünmesini takiben tamamen dağılır. İlginç olarak, bitki hücreleri tamamen farklı bir mekanizmayla bölünüyor olmasına rağmen (bkz. Bölüm 15), aktin hücre bölünmesi konumunda toplanır. Bakteriyel aktin-benzeri protein de



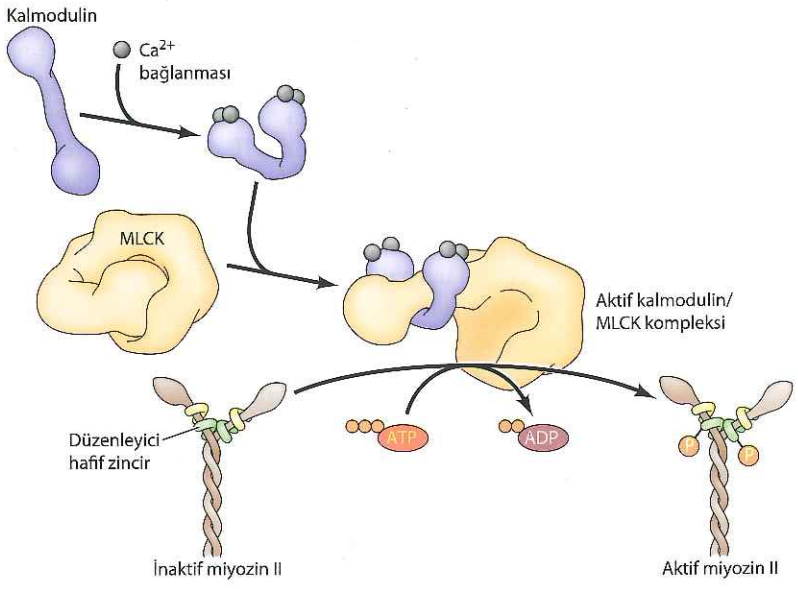
Şekil 13.29 Kas dışındaki hücrelerde kasılabilir yapılar Miyozin II' nin bipolar filamanları aktin filamanlarını zıt yönlerde kaydırarak kasılmayı sağlar.



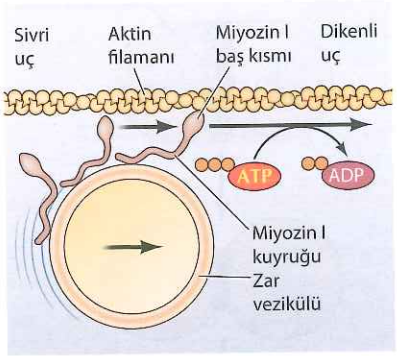
Şekil 13.30 Sitokinez Mitozun (nükleer bölünme) tamamlanmasını takiben aktin filamanları ve miyozin II' den oluşan kasılabilir halka yapısı hücreyi ikiye böler.

hücre bölünmesinde işlev gördüğü için, aktinin bu rölünün evrimsel olarak çok eskiye dayandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, bakterilerde miyozinlerin veya diğer motor proteinlerinin olduğu bilinmemektedir.

Çizgili kasta aktin-miyozin kasılmasının kontrolü, daha önce de bahsedildiği gibi, Ca^{2+}'un troponine bağlanması ile sağlanır. Buna karşın, kas dışı hücrelerde ve düz kasta kasılma, miyozin II hafif zincirlerinden düzenleyici hafif zincir olarak adlandırılan birisinin fosforillenmesi ile kontrol edilir (Şekil 13.31). Düzenleyici hafif zincirin fosforillenmesinin, bu hücrelerde en azından iki etkisi vardır: miyozinin filamanlar halinde yapılanmasını başlatır, miyozinin kasılma için gerekli katalitik aktivitesini artırır. Bu fosforillenmeyi katalizleyen enzim **miyozin hafif-zincir kinazdır.** Bu kinaz, Ca^{2+} bağlayan bir protein olan **kalmodulin** ile bağlanma yoluyla düzenlenir. Sitozoldeki Ca^{2+}'un artması kalmodulinin kinaza bağlanmasını sağlar, bu da miyozinin düzenleyici zincirinin fosforillenmesi ile sonuçlanır. Bu yüzden sitozoldeki Ca^{2+}'un artması, indirekt yolla olsa da, çizgili kastaki gibi düz kasta ve kas dışı hücrelerde de miyozinin aktive olmasından sorumludur.



Şekil 13.31 Miyozinin fosforillenme ile düzenlenmesi Ca^{2+} kalmoduline bağlanır ve bu yapı da sonrasında miyozin hafif zincir kinaza (MLCK) bağlanır. Aktif kalmodulin-MLCK kompleksi daha sonra miyozin II düzenleyici hafif zincirini fosforiller ve miyozinin inaktif formdan aktif forma dönüşmesini sağlar.

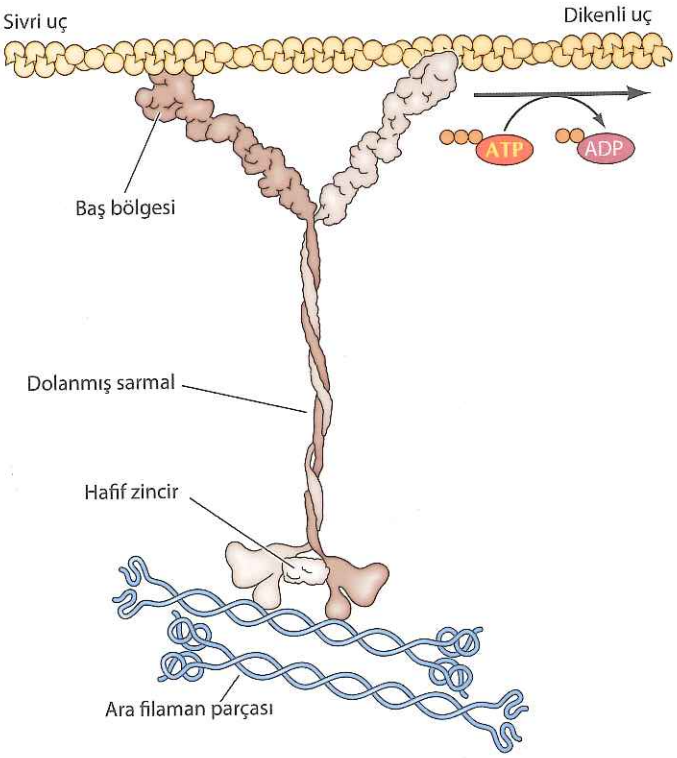


Şekil 13.32 Miyozin I Miyozin I, miyozin II'ye benzer şekilde, ATP ile çalışan bir motor proteini olarak etki gösteren bir baş grubu içerir, fakat nispeten kısa bir kuyruğu vardır ve dimer ya da filaman yapıları oluşturmaz. Miyozin I, kasılmayı indükleyemese de, aktin filamanları boyunca (artı uca doğru) hareket eder ve kuyruğuna tutunan çeşitli kargoları (zar vezikülleri gibi) taşır.

Konvansiyonel olmayan miyozinler

Kas dışı hücrelerde Miyozin II'ye (kas hücrelerinde en çok bulunan iki-başlı miyozin) ek olarak 20'den fazla farklı miyozin tipi bulunur. Bu **konvansiyonel olmayan miyozinler** filamanlar oluşturmaz ve kasılma ile ilişkili değildir. Bununla birlikte zar veziküllerinin, organellerin ve diğer kargoların aktin filamanları boyunca taşınması gibi çok çeşitli hücre hareketleri için önemlidir.

Konvansiyonel olmayanmiyozinlere örnek olarak **miyozin I** verilebilir (Şekil 13.32). Miyozin I proteinleri, miyozin II gibi, moleküler motor olarak işlev gören globüler bir baş grubu içerir. Ancak, miyozin I proteinleri, miyozin II'deki gibi uzun kuyrukları olmayan çok daha küçük moleküllerdir (memeli hücrelerinde yaklaşık 110 kd) ve dimer oluşturmaz. Bunun yerine kuyrukları, zar vezikülleri ya da organeller gibi diğer yapılara bağlanabilir. Böylece Miyozin I'in bir aktin filamanı boyunca hareketi, kendisine tutunmuş kargonun taşınmasını sağlayabilir. Miyozin I'in bir görevi de, daha önce tartışıldığı üzere, barsak mikroviluslarının plazma zarlarındaki aktin demetlerinin bağlanmasına yardımcı olmaktır (bkz. Şekil 13.18). Bu yapılarda, miyozin I'in motor aktivitesi, plazma zarını aktin demeti boyunca mikroviluslarının uçlarına doğru hareket ettirir. Miyozin I'in ek fonksiyonları, vezikül ve organellerin aktin filamanları boyunca taşınması ve fagositoz ya da yalancı ayak uzaması sırasında plazma zarının hareketinin sağlanmasını içerir.



Diğer alışılmadık miyozinler miyozin II gibi dimerler oluşturur. Örneğin, miyozin V çift-başlı bir dimer olarak vezikül ve diğer kargonun aktin filamanları boyunca taşınmasında görev alır (Şekil 13.33). Miyozin II nöronlarda organel ve makromolekül taşınmasında özellikle önemli rol oynarken miyozin V hücre çıkıntılarının uzaması için yeni zar bileşenleri sağlamada gereklidir. Eksi uçlara hareket eden Miyozin VI dışında miyozinlerin tümü aktin filamanlarının artı uçlarına doğru hareket eder. Kargo taşınmasının yanı sıra, alışılmadık miyozinlerden bazıları aktin filamanlarının yeniden düzenlenmesine ya da aktin filamanlarının plazma zarına tutunmasına katkıda bulunur.

Şekil 13.33 Miyozin V Miyozin V, miyozin II gibi iki-başlı bir miyozindir. ATP hidrolizi ile organelleri ve diğer kargoları, (örneğin, arafilamanlar) aktin filamanların artı uçlarına doğru taşır. Şekilde verilen model X-ışını kristallografisi verilerine dayanarak elde edilmiştir. (R.D. Vale, 2003. *Cell* 113: 467).

Mikrotübüller

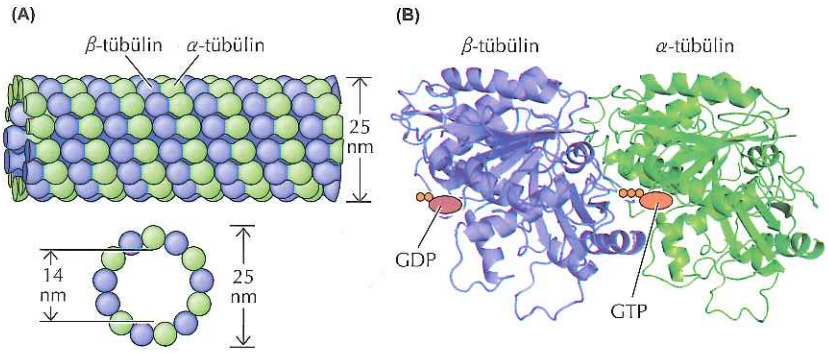
İkinci temel hücre iskeleti elemanı olan **mikrotübüller** yaklaşık 25 nm çapındaki sert, içi boş çubuklardır. Aktin filamanları gibi, mikrotübüller de hücre içinde devamlı yapılanıp ayrışabilen dinamik yapılardır. Hem hücre şeklinin belirlenmesinde, hem de hücrelerin yer değiştirmesinin bazı tiplerini, organellerin hücre içindeki taşınmasını ve mitoz sırasında kromozomların ayrılmasını da içeren çok çeşitli hücre hareketlerinde görevleri vardır.

Mikrotübüllerin yapısı ve dinamik organizasyonu

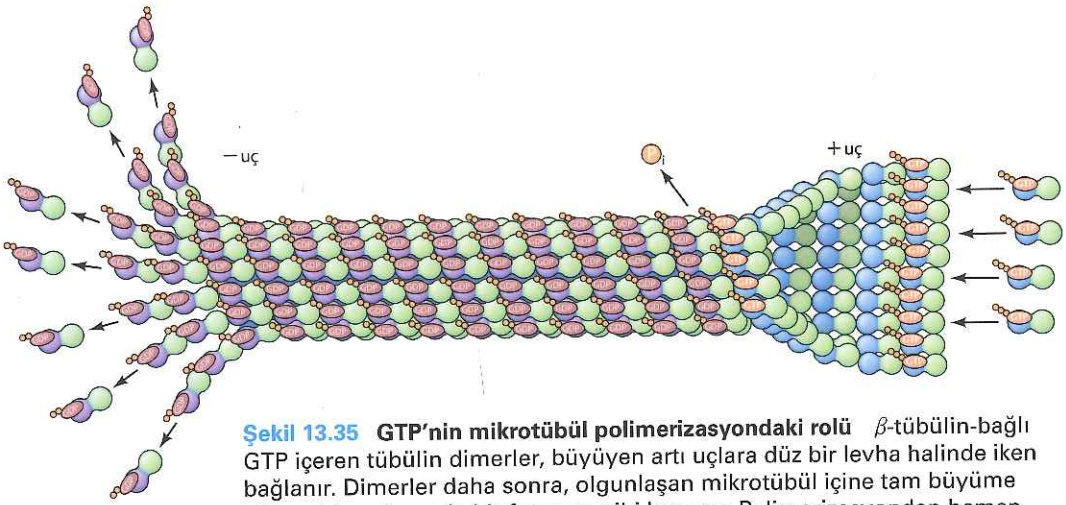
Mikrotübüller **tübülin** denilen tek bir çeşit globüler proteinden oluşmuştur. Mikrotübüllerin yapıtaşları, birbiri ile çok benzer 55 kd'luk iki polipeptidden, α-tübülin ve β-tübülin, oluşan tübülin dimerleridir. Aktin gibi, α- ve β-tübülin birbiri ile ilintili küçük gen aileleri (sırasıyla altı ve yedi genden oluşan) tarafından kodlanır. Ek olarak üçüncü bir tübülin tipi (γ-tübülin) sentrozomda yer alır ve mikrotübül yapılanmasında (birazdan anlatılacak) kritik bir rol oynar. Bütün bitki ve hayvan tübülinlerinin evrimsel atasının, prokaryot proteini FtsZ'ye benzeyen bir protein olduğu düşünülmektedir. Bu protein plazma zarının altında bir halka yapısı oluşturur ve bakteriyel hücre duvarı sentezini yönetir.

Tübülin dimerlerinin polimerleşmesi ile, boru şeklinde bir kor etrafında yapılanmış, genelde 13 doğrusal önfilaman içeren mükrotübüller oluşur (Şekil 13.34). Tübülin dimerlerinin baş-kuyruk yönünde dizilmesi ile oluşan önfilamanlar, paralel şekilde bir araya gelmiştir. Sonuçta, mikrotübüller (aktin filamanları gibi) artı ve eksi uçlar olarak adlandırılan iki farklı ucu olan polar moleküllerdir. Bu polarite, aktin filamanlarının polaritesinin miyozin hareketinin yönünü belirlemesinde olduğu gibi, moleküler motorun mikrotübül boyunca hareketinin yönünü belirler.

Mikrotübüller hızlı bir yapılanma ve ayrışma döngüsüne girebilen dinamik yapılardır. Hem α- hem de β-tübülin, ATP bağlı aktinin polimerleşmesinin kontrolündeki rolü ile aynı işleve sahip GTP'ye bağlanır (bkz. Şekil 13.34). Genelde, β-tübüline bağlı GTP (α-tübüline bağlı olan değil) polimerleşmeden



Şekil 13.34 Mikrotübüllerin yapısı (A) α ve β-tübülin dimerleri polimerleşerek mikrotübülleri oluşturur. Mikrotübüller ise ortası boş bir yapının etrafını saran 13 önfilaman yapısının birleşmesiyle meydana gelir. (B) Bir tübülin dimerinin yapısı; β-tübüline GTP bağlı ve α-tübüline GDP bağlı.

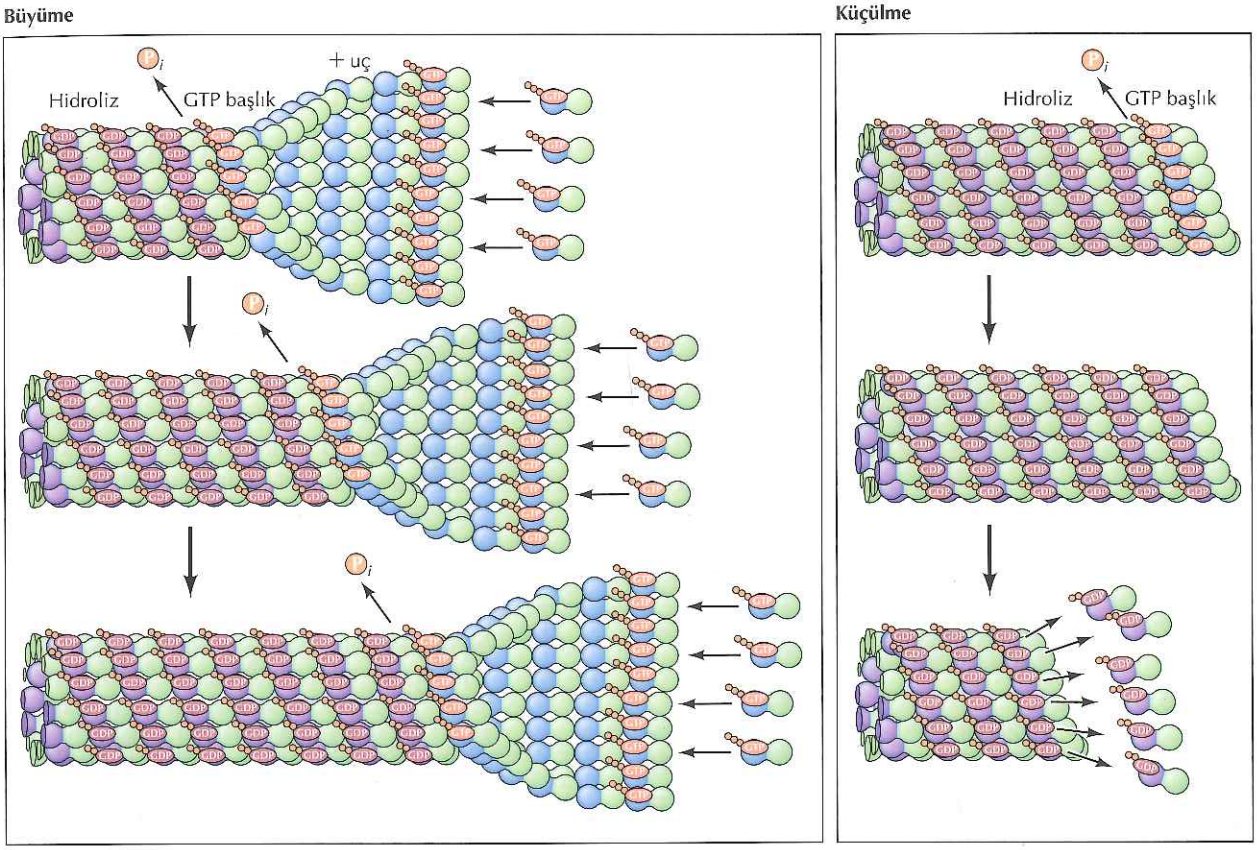


Şekil 13.35 GTP'nin mikrotübül polimerizasyondaki rolü β-tübülin-bağlı GTP içeren tübülin dimerler, büyüyen artı uçlara düz bir levha halinde iken bağlanır. Dimerler daha sonra, olgunlaşan mikrotübül içine tam büyüme bölgesinin arkasında bir fermuar gibi kapanır. Polimerizasyondan hemen sonra β-tübüline bağlı GTP'ye hidrolize olur. GDP-bağlı tübülin mikrotübül içinde daha az kararlı olduğundan dimerler eksi uçtan hızla ayrılır.

çok kısa bir süre sonra GDP'ye hidrolize olur (Şekil 13.35). Bu GTP hidrolizi, tübülin dimerlerinin birbirlerine bağlanma eğilimini zayıflatarak GDP-bağlı tübülinin mikrotübüllerin eksi ucundan hızla ayrışmasına neden olabilir. Sonuç olarak hücre içinde mikrotübüllerin eksi uçları hızlı depolimerizasyonu engellemek için korunmalıdır ve bu genellikle mikrotübül uçlarını mikrotübül organize edici bölgede yani sentrozomda tutarak sağlanır.

Eksi uçlarında kararlı halde tutulan mikrotübüllerde, artı uçtaki hızlı GTP hidrolizi **dinamik kararsızlık** olarak bilinen bir davranışa neden olur. Dinamik kararsızlık bireysel mikrotübüllerin uzama ve kısalma döngüleri (kurtarma ve yıkım olarak adlandırılan) arasında gidip gelir (Şekil 13.36). Bir mikrotübülün uzayacağı ya da kısalacağı, kısmen, tübülin eklenme oranına karşılık GTP hidroliz oranı ile belirlenir. Yeni GTP-bağlı tübülin molekülleri, GTP'nin hidrolizinden daha hızla eklendikleri sürece, mikrotübülün artı ucunda GTP başlığı kalır ve mikrotübül uzamaya devam eder. Bununla birlikte, polimerleşme oranı yavaşsa, mikrotübülün artı ucundaki GTP bağlı tübülin GDP'ye hidrolize edilecektir. Bu olduğu zaman, GDP bağlı tübülin ayrışacak, mikrotübülde hızlı depolimerizasyon ve kısalma (yıkım) ile sonuçlanacaktır.

İlk olarak 1984'de Tim Mitchison ve Marc Kirchner tarafından tanımlanan dinamik kararsızlık, çoğu mikrotübülün hücre içinde devamlı ve hızlı dönüşümü ile sonuçlanır. Bazıları için yarılanma süresi yalnızca birkaç dakikadır. Daha sonra da bahsedileceği gibi, mikrotübüllerin bu hızlı dönüşümü, özellikle mitoz sırasında gerçekleşen hücre iskeleti değişiklikleri için çok önemlidir. Mikrotübüllerin mitozdaki merkezi rolleri nedeniyle, mikrotübül yapılanmasını etkileyen ilaçlar, yalnızca hücre biyolojisi çalışmaları için deneysel bir araç olarak değil, kanser tedavisinde de yararlıdır. Sık kullanılan deneysel ilaçlara örnek olarak, tübüline bağlanan ve mikrotübül polimerleşmesini engelleyerek mitozu durduran **kolçisin** ve **kolsemid** verilebilir. İki benzer ilaç **(vinkristin** ve **vinblastin),** seçici olarak hızla bölünen hücreleri blokladığı için kanser kemoterapisinde kullanılmaktadır. Yararlı bir diğer ilaç olan **taksol** mikrotübüllerin yapılanmasını engellemek yerine stabilize eder. Bu kararlılık



Şekil 13.36 Mikrotübüllerin dinamik kararsızlığı Dinamik kararsızlık β-tübüline bağlı GTP'nin polimerizasyon sırasında ya da hemen sonrasında hidrolizinden kaynaklanır ve bu GTP'nin komşu moleküllere bağlanma eğilimini düşürür. Mikrotübüllerin uzaması, yeni GTP bağlı tübülin moleküllerinin eklenmesi GTP hidrolizinden daha hızlı gerçekleştiği sürece devam eder ve böylece bir GTP başlığı büyüyen uçta tutulur. Ancak GTP hidrolizi yeni alt birimlerin eklenmesinden daha hızlı ise, mikrotübülün artı ucundaki GDP-bağlı tübülinin varlığı ayrılmaya ve kısalmaya yol açar.

hücre bölünmesini de engeller ve taksol deneysel kullanımı kadar antikanser ajan olarak da kullanılır.

Mikrotübül-bağlayıcı proteinler (MAP'lar), tıpkı aktin-bağlayıcı proteinlerin aktin filamanlarının davranışını düzenlediği gibi, hücrelerde mikrotübüllerin dinamik davranışını düzenler (Tablo 13.2). Önceden

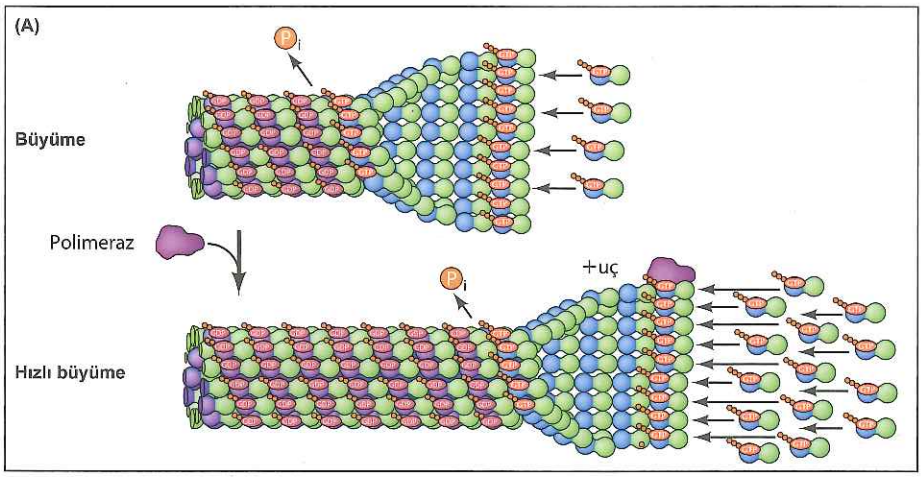
Bilgi İçin

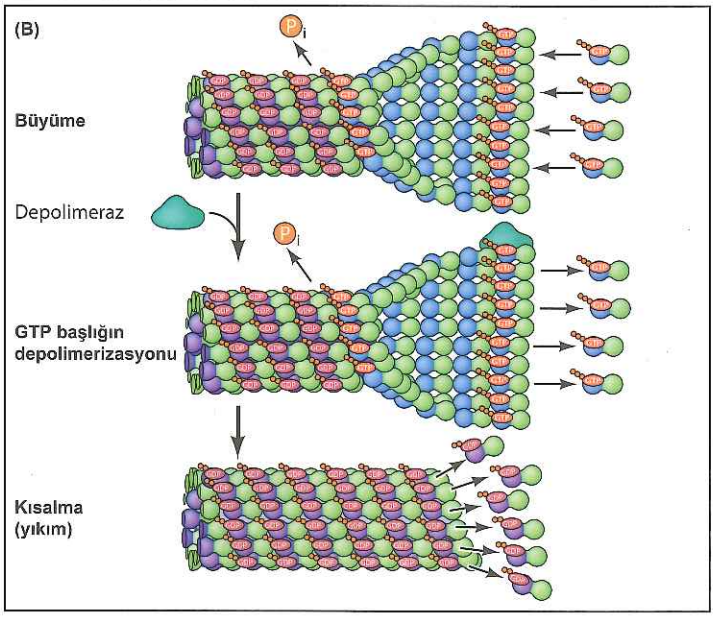
Taksol ilk olarak Pasifik porsuk ağacından elde edilmiştir. Pasifik porsuk ağacı bilinen en yavaş büyüyen ağaçlardan olup bir hastayı tedavi etmek için yeterli taksol ancak birkaç ağaçtan elde edilebilir ve bu da ilacın elde bulunurluğunu sınırlamaktadır. Neyseki, taksol ve türevleri günümüzde ekonomik bir şekilde benzer ağaçlardan yarı sentetik olarak üretilmekte ve kimyasal olarak modifiye edilebilmektedir.

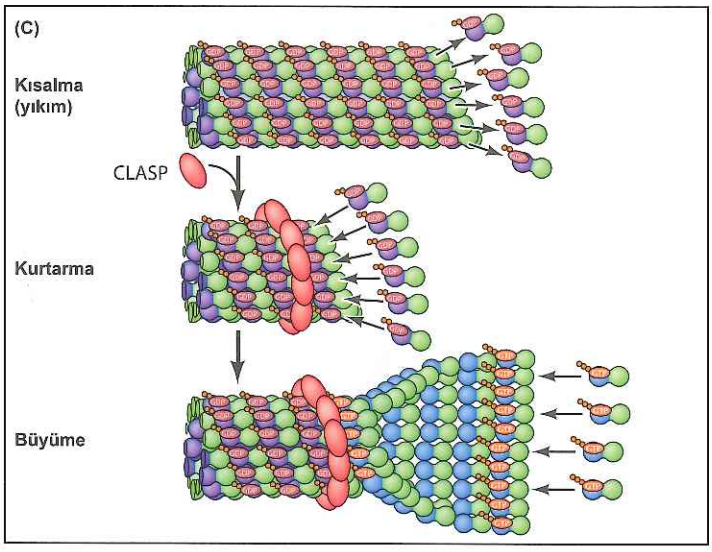
Tablo 13.2 Mikrotübül-Bağlı Proteinler (MAP'lar)

Hücresel rol	Temsilci proteinler
Mikrotübül oluşumunun başlaması	γ-tubulin halka kompleksi
Uç polimerizasyonu	XMAP215
Uç depolimerizasyonu	Kinezinler 8 ve 13
Koparma	Katanin
Uzunluk açısından kararlılık	Tau, MAP1, MAP2, MAP4
Kurtarılma	CLASP

Animasyon 13.3
sites.sinauer.com/cooper7e/a13.3
Mikrotübül Birleşmesi Tübülin dimerleri, mikrotübüllere birleşmek üzere polimerize oldukları gibi yıkılmak üzere depolimerize de olur.







Şekil 13.37 Mikrotübül-bağlı proteinlerin dinamik kararsızlıktaki rolleri Mikrotübüllerin dinamik davranışı, kendi artı uçlarına bağlanan mikrotübül-bağlı proteinler (MAP) tarafından düzenlenir. (A) Polimerazlar GTP-bağlı tübülinlerin eklenmesini artırarak büyümesini hızlandırır. (B) Buna karşılık, depolimerazlar GTP-tübülini artı ucundan ayırarak mikrotübül kısalmasına (yıkım) neden olur. (C) CLASP proteinleri mikrotübülleri, parçalara ayrılmalarını durdurup yeniden büyümelerini başlatarak yıkımdan kurtarır.

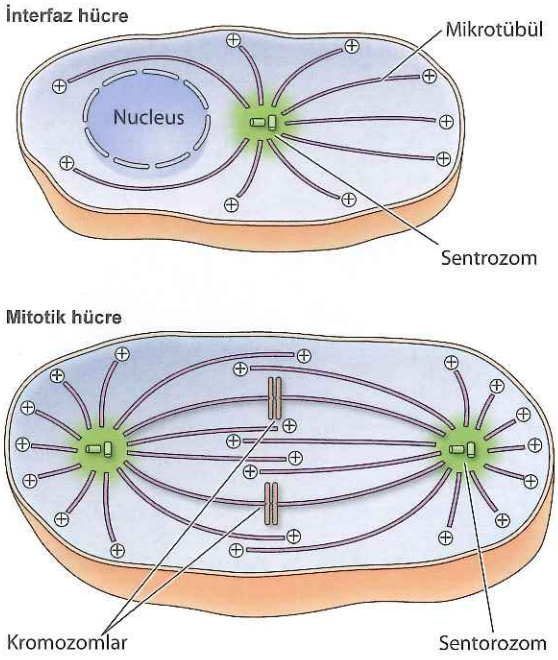
tartışıldığı üzere, mikrotübüllerin eksi uçları depolimerizasyonu önleyen proteinler tarafından stabilize edilir. Mikrotübüllerin artı uçlarının uzaması veya kısalması, tübülin dimerlerinin polimerizasyonunu ya da depolimerizasyonunu kolaylaştıran MAP'lar tarafından düzenlenir (Şekil 13.37). MAP'ların bir sınıfı mikrotübüllerin artı uçlarına bağlanarak büyümelerini yaklaşık on kat hızlandıran polimerazlardır. Bunun aksine depolimerazlar, GTP-tübülinlerin mikrotübüllerin artı uçlarından ayrılmasını hızlandırarak kısalmalarını uyarır. Bir başka MAP sınıfı, CLASP proteinleri, mikrotübül yıkımını baskılama ve kurtarmayı teşvik etme rolü oynar ve bunu açıkça mikrotübüllerin parçalara ayrılmasını durdurup yeniden biraraya gelmelerini başlatarak sağlar. Dolayısıyla, bu MAP'ların karşıt etkileri mikrotübül büyümesi ile hücrenin gereksinimlerine yanıt olarak kısalması arasındaki geçişi kontrol eder. Bazı MAP'lar artı ucu izleyen proteinler olup mikrotübül artı uçlarına bağlanır ve mikrotübüllerin diğer hücresel yapılara (plazma zarı ya da endoplazmik retikulum gibi)

tutunmasına ve mikrotübül dinamiklerini düzenlemesine aracılık eder.

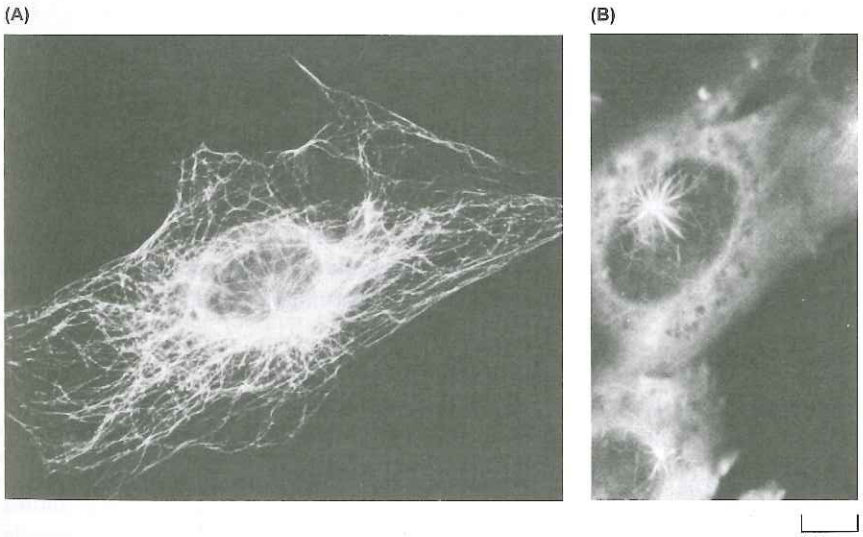
Mikrotübüllerin yapılanması

Hayvan hücrelerinde, çoğu mikrotübül merkez interfazdaki (bölünmeyen) hücrelerde, nükleusa komşu olarak yerleşmiş olan **sentrozomdan** (ilk olarak 1888'de Theodore Boveri tarafından tanımlanmıştır) uzar (Şekil 13.38). Mitoz sırasında mikrotübüller benzer şekilde, kromozomların ayrılmasından ve yavru hücrelere dağılımından sorumlu mitotik iği oluşturmak üzere, kopyalanmış sentrozomlardan dışarıya doğru uzanır. Sentrozom bu nedenle mikrotübüllerin hayvan hücreleri içindeki düzenlerinin belirlenmesinde **mikrotübül organize edici merkez** olarak anahtar rol oynar. Ancak bitki hücrelerinde organize olmuş bir sentrozom ya da başka bir mikrotübül organize edici merkez bulunmaz. Bunun yerine, bitki hücrelerinde mikrotübüller dağınık haldedir ve plazma zarının altında, bitki hücre duvarlarının sentezine rehber etmede anahtar rol oynayan, bir dizi oluşturur (Bölüm 15'te tartışılmıştır).

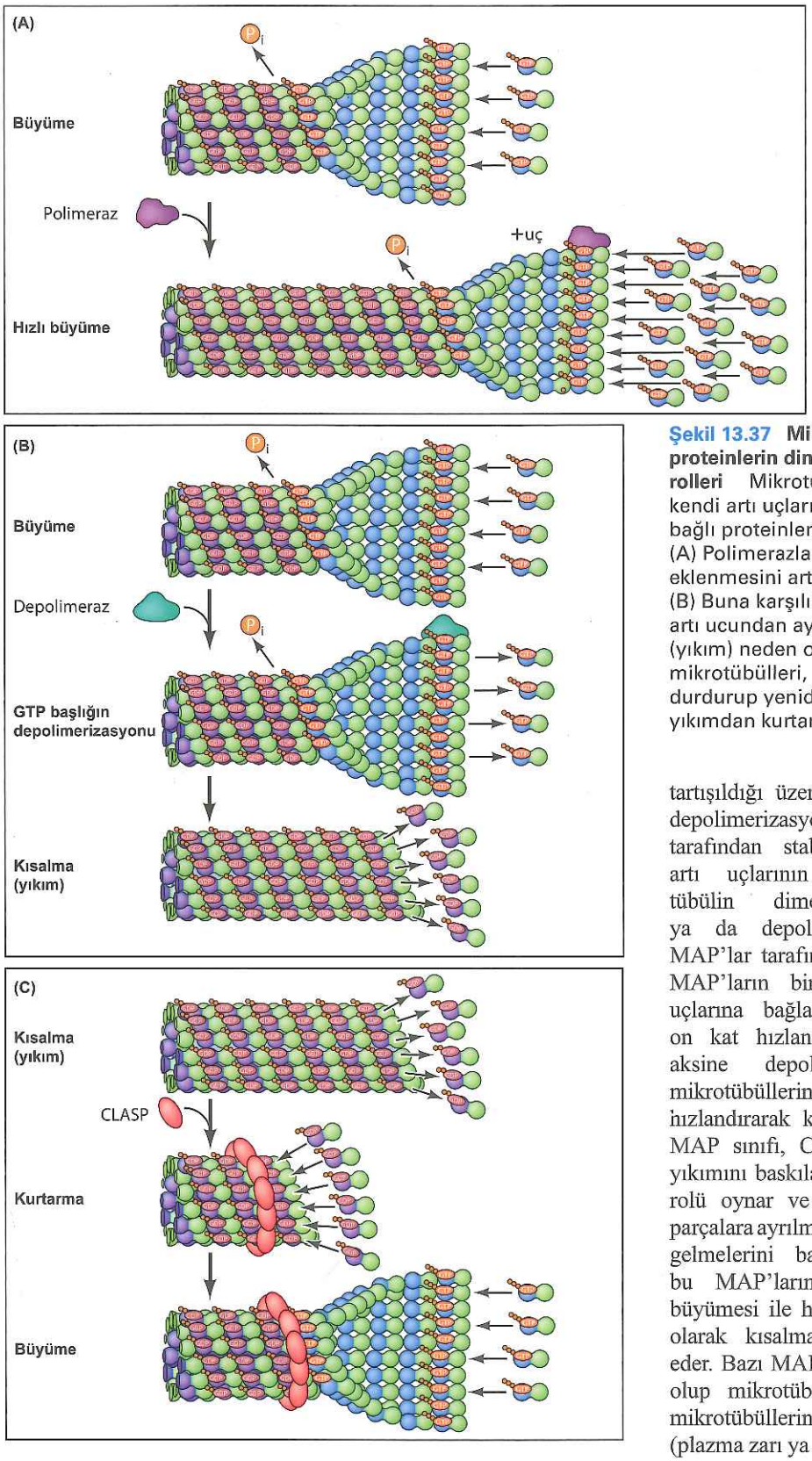
Hayvan hücrelerinde sentrozom, sentrozomdan eksi uçları sentrozoma tutunmuş olarak hücre kenarına doğru uzayan mikrotübüllerin yapılanması için bir başlangıç noktası olarak görev yapar. Bu, mikrotübüllerin yapılanması kolsemid ile engellenen hücrelerde açıkça görülebilir (Şekil 13.39). İlaç uzaklaştırıldığı zaman, hücreler eski haline döner ve sentrozomdan dışarıya doğru uzayan yeni mikrotübüller görülebilir. Dolayısıyla, mikrotübül uzamasının sentrozomdan başlaması, hücre içindeki mikrotübüllerin polaritesini sağlar. Mikrotübüller



Şekil 13.38 Mikrotübüllerin hücre içi düzenlenmesi Mikrotübüllerin eksi uçları sentrozomda tutuludur. İnterfaz hücrelerinde sentrozom nükleus yakınlarında yerleşiktir ve mikrotübüller hücre çevresine doğru uzanmaktadır. Mitoz sırasında ise ikilenen sentrozomlar ayrılır ve mikrotübüller mitotik iği oluşturmak üzere yeniden düzenlenir.



Şekil 13.39 Mikrotübüllerin sentrozomdan uzaması Fare fibroblastlarındaki mikrotübüller, tübüline spesifik antikor kullanarak immünfloresan mikroskopi ile görüntülenmiştir. (A) Normal interfaz hücrelerinde mikrotübüllerin dağılımı (B) Bu hücre, mikrotübüllerin ayrışması için bir saat kolsemid ile muamele edilmiştir. Daha sonra ilaç uzaklaştırılmış, hücrenin eski haline dönmesi için 30 dakika beklenmiştir. Bu aşamada sentrozomdan uzayan yeni mikrotübüllerin görüntülenmesi sağlanmıştır. (M. Osborn ve K. Weber, 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 73: 867)



Şekil 13.37 Mikrotübül-bağlı proteinlerin dinamik kararsızlıktaki rolleri Mikrotübüllerin dinamik davranışı, kendi artı uçlarına bağlanan mikrotübül-bağlı proteinler (MAP) tarafından düzenlenir. (A) Polimerazlar GTP-bağlı tübülinlerin eklenmesini artırarak büyümesini hızlandırır. (B) Buna karşılık, depolimerazlar GTP-tübülini artı ucundan ayırarak mikrotübül kısalmasına (yıkım) neden olur. (C) CLASP proteinleri mikrotübülleri, parçalara ayrılmalarını durdurup yeniden büyümelerini başlatarak yıkımdan kurtarır.

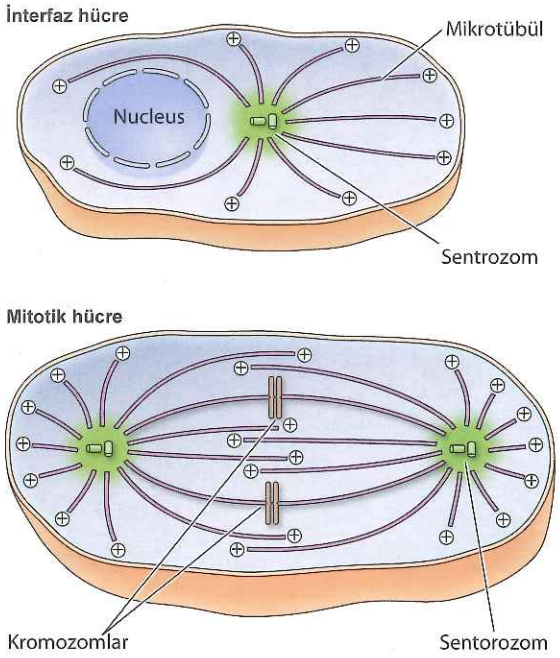
tartışıldığı üzere, mikrotübüllerin eksi uçları depolimerizasyonu önleyen proteinler tarafından stabilize edilir. Mikrotübüllerin artı uçlarının uzaması veya kısalması, tübülin dimerlerinin polimerizasyonunu ya da depolimerizasyonunu kolaylaştıran MAP'lar tarafından düzenlenir (Şekil 13.37). MAP'ların bir sınıfı mikrotübüllerin artı uçlarına bağlanarak büyümelerini yaklaşık on kat hızlandıran polimerazlardır. Bunun aksine depolimerazlar, GTP-tübülinlerin mikrotübüllerin artı uçlarından ayrılmasını hızlandırarak kısalmalarını uyarır. Bir başka MAP sınıfı, CLASP proteinleri, mikrotübül yıkımını baskılama ve kurtarmayı teşvik etme rolü oynar ve bunu açıkça mikrotübüllerin parçalara ayrılmasını durdurup yeniden biraraya gelmelerini başlatarak sağlar. Dolayısıyla, bu MAP'ların karşıt etkileri mikrotübül büyümesi ile hücrenin gereksinimlerine yanıt olarak kısalması arasındaki geçişi kontrol eder. Bazı MAP'lar artı ucu izleyen proteinler olup mikrotübül artı uçlarına bağlanır ve mikrotübüllerin diğer hücresel yapılara (plazma zarı ya da endoplazmik retikulum gibi)

tutunmasına ve mikrotübül dinamiklerini düzenlemesine aracılık eder.

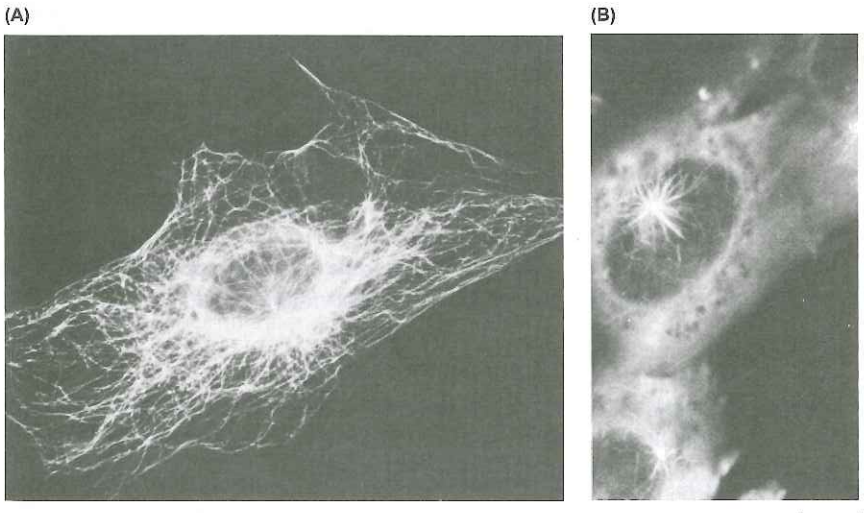
Mikrotübüllerin yapılanması

Hayvan hücrelerinde, çoğu mikrotübül merkez interfazdaki (bölünmeyen) hücrelerde, nükleusa komşu olarak yerleşmiş olan **sentrozomdan** (ilk olarak 1888'de Theodore Boveri tarafından tanımlanmıştır) uzar (Şekil 13.38). Mitoz sırasında mikrotübüller benzer şekilde, kromozomların ayrılmasından ve yavru hücrelere dağılımından sorumlu mitotik iği oluşturmak üzere, kopyalanmış sentrozomlardan dışarıya doğru uzanır. Sentrozom bu nedenle mikrotübüllerin hayvan hücreleri içindeki düzenlerinin belirlenmesinde **mikrotübül organize edici merkez** olarak anahtar rol oynar. Ancak bitki hücrelerinde organize olmuş bir sentrozom ya da başka bir mikrotübül organize edici merkez bulunmaz. Bunun yerine, bitki hücrelerinde mikrotübüller dağınık haldedir ve plazma zarının altında, bitki hücre duvarlarının sentezine rehber etmede anahtar rol oynayan, bir dizi oluşturur (Bölüm 15'te tartışılmıştır).

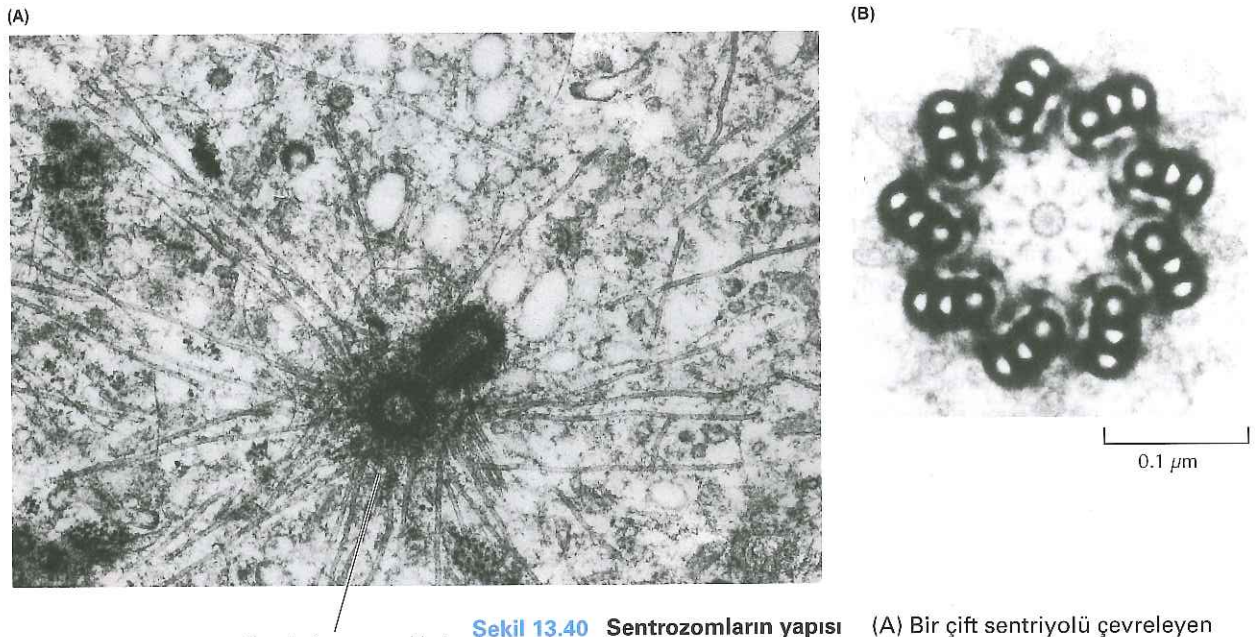
Hayvan hücrelerinde sentrozom, sentrozomdan eksi uçları sentrozoma tutunmuş olarak hücre kenarına doğru uzayan mikrotübüllerin yapılanması için bir başlangıç noktası olarak görev yapar. Bu, mikrotübüllerin yapılanması kolsemid ile engellenen hücrelerde açıkça görülebilir (Şekil 13.39). İlaç uzaklaştırıldığı zaman, hücreler eski haline döner ve sentrozomdan dışarıya doğru uzayan yeni mikrotübüller görülebilir. Dolayısıyla, mikrotübül uzamasının sentrozomdan başlaması, hücre içindeki mikrotübüllerin polaritesini sağlar. Mikrotübüller



Şekil 13.38 Mikrotübüllerin hücre içi düzenlenmesi Mikrotübüllerin eksi uçları sentrozomda tutuludur. İnterfaz hücrelerinde sentrozom nükleus yakınlarında yerleşiktir ve mikrotübüller hücre çevresine doğru uzanmaktadır. Mitoz sırasında ise ikilenen sentrozomlar ayrılır ve mikrotübüller mitotik iği oluşturmak üzere yeniden düzenlenir.



Şekil 13.39 Mikrotübüllerin sentrozomdan uzaması Fare fibroblastlarındaki mikrotübüller, tübüline spesifik antikor kullanarak immünfloresan mikroskopi ile görüntülenmiştir. (A) Normal interfaz hücrelerinde mikrotübüllerin dağılımı (B) Bu hücre, mikrotübüllerin ayrışması için bir saat kolsemid ile muamele edilmiştir. Daha sonra ilaç uzaklaştırılmış, hücrenin eski haline dönmesi için 30 dakika beklenmiştir. Bu aşamada sentrozomdan uzayan yeni mikrotübüllerin görüntülenmesi sağlanmıştır. (M. Osborn ve K. Weber, 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 73: 867)



Şekil 13.40 Sentrozomların yapısı (A) Bir çift sentriyolü çevreleyen sentriyol çevre maddesinden saçılan mikrotübülleri gösteren sentrozoma ait elektron mikrograf. (B) Yapısındaki dokuz adet üçlü mikrotübülün görüldüğü sentriyole ait enine kesit.

artı uçlarına tübülin eklenmesi ile, sentrozomdan dışarıya, hücre kenarına doğru uzarlar, yani sentrozomun rolü mikrotübül uzamasını başlatmaktır. Sentrozomdaki mikrotübüllerin yapılanmasından sorumlu anahtar protein, ilk olarak mantarlarda tanımlanmış, az rastlanan bir tübülin türü olan γ-tübülindir. **γ-tübülin halka kompleksi** adı verilen bir yapının içinde sekiz ya da daha fazla proteinle bağlantılıdır. Bunun, hız sınırlayıcı çekirdeklenme aşamasını bertaraf ederek hızlı mikrotübül uzaması için bir nüve olabileceği düşünülmektedir.

Çoğu hayvan hücresinin sentrozomu, birbirine dik yerleşmiş, amorf bir **sentriyol çevre maddesi** ile çevrelenmiş, bir çift **sentriyol** içerir (Şekil 13.40). Sentriyoller, dokuz adet üçerli mikrotübülden oluşan at-arabası tekerleğine benzer bir yapı etrafında organize olmuş silindirik yapılardır. Sentriyoller ayrıca kirpik ve kamçının bazal cisimleri olarak hücre yüzeyinde işlev görür (bu bölümde daha sonra anlatılacak). Ancak sil ve kamçıların oluşumu için gerekli olmamalarına rağmen sentriyoller sentrozomun mikrotübül düzenleyici görevleri için gerekli değildir ve tek hücreli ökaryotların ve mayozdaki hayvan hücrelerinin çoğunda (fare yumurta hücreleri gibi) bulunmaz. Senriyoller değil, sentriyol çevre maddesi γ-tübülin halka kompleksini içerir ve mikrotübül yapılanmasını başlatarak mikrotübül eksi uçlarını bağlamada rol oynar.

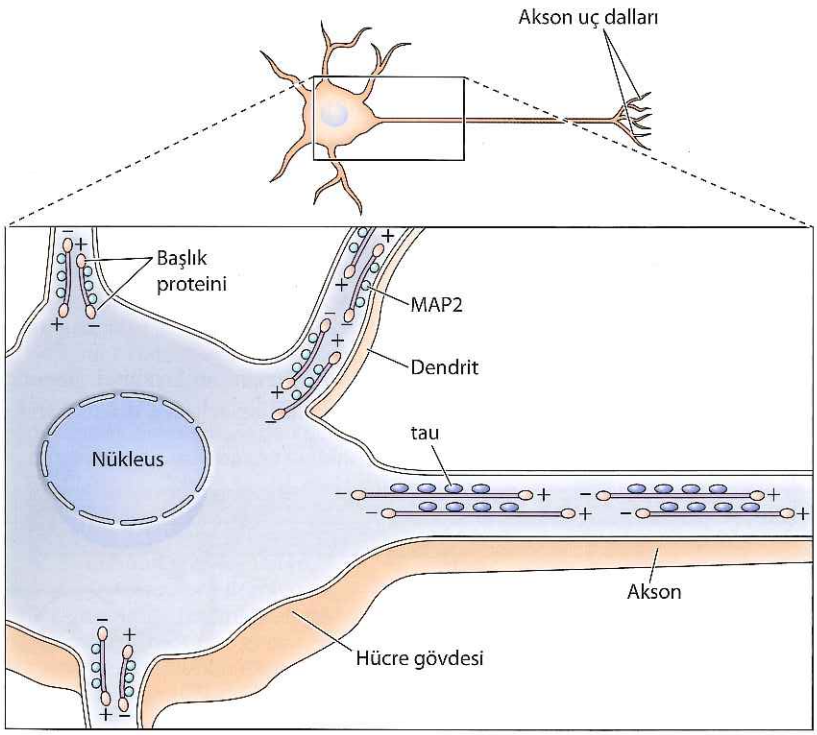
Hücrelerde mikrotübüllerin organizasyonu

Yukarıda tartışıldığı üzere, mikrotübüllerin hücredeki davranışları MAP'lar tarafından düzenlenir (bkz. Tablo 13.2). Çoğu MAP mikrotübül artı uçlarına bağlanarak dinamik kararsızlığı kontrol eder, ancak bazıları da ya mikrotübülleri keserek ya da mikrotübüllere uzunlamasına bağlanıp kararlı hale getirerek etkili olur. Mikrotübül kararlılığı ayrıca tübülinin çok sayıda post-translasyonel modifikasyonu ile de düzenlenir. Hem α- hem de β-tübülin

fosforilasyon, asetilasyon, palmitol eklenmesi, karboksi ucundan tirozin eklenmesi ya da çıkarılması ve çoklu glutamin ya da glisin eklenmesi ile değiştirilebilir. Bu post-translasyonel modifikasyonlar, özelleşmiş MAP'lara bağlanma bölgeleri sağlayarak mikrotübül davranışını etkiler.

MAP'ların etkileşimleri hücreye mikrotübülleri belli bölgelerde kararlı hale getirmesi için izin verir ve hücre şeklini ve polaritesini belirlemede önemli bir mekanizma sağlar. Çok sayıda MAP hücre tipine özgüdür. En erken tanımlanmış olanlardan bazıları MAP-1, MAP-2 ve tau (nöronal hücrelerden elde edilen) ile nöronal olmayan tüm omurgalı hücrelerinde bulunan MAP-4'tür. Tau proteini, Alzheimer'lı hastaların beyinlerindeki karakteristik lezyonların ana elemanı olduğu için geniş ölçüde çalışılmaktadır (bkz. Bölüm 9-Moleküler Tıp).

Kararlı mikrotübüllerin hücre polaritesini düzenlemedeki rolünü gösteren güzel bir örnek, sinir hücrelerinde hücre gövdesinden dışarı doğru uzayan iki farklı tipteki oluşumdur (akson ve dendritler) (Şekil 13.41). Hem



Şekil 13.41 Sinir hücrelerinde mikrotübüllerin düzenlenmesi Sinir hücrelerinin (nöronların) gövdelerinden dışarıya doğru iki farklı oluşum çıkar. Dendritler diğer sinir hücrelerinden uyarıları alan kısa oluşumlardır. Uzun tek bir akson ise uyaranları hücre gövdesinden, diğer hücrelere, yani ya diğer nöronlara ya da kas gibi efektör hücrelere taşır. Akson ve dendritlerdeki kararlı mikrotübüller sentrozomda tutulu olmak yerine sitoplazmada son bulur. Dendritlerde mikrotübüller artı uçları hem hücre gövdesine yönelik hem de dışarıya yönelik olmak üzere her iki yöne doğrudur. Bunun tersine, bütün akson mikrotübülleri artı uçları aksonun ucuna doğru olacak şekilde yerleşiktir. Mikrotübül-bağlı proteinler (MAP) hem artı ve eksi uçları kapatır hem de mikrotübülleri uzunlukları boyunca bağlanarak stabilize eder (dendritlerde MAP2 ve aksonlarda tau).

aksonlar, hem de dendritler kararlı mikrotübüller ve bu bölümde bir sonraki kısımda anlatılacak olan, nörofilamanlar tarafından desteklenir. Ancak, sinir hücrelerindeki mikrotübüller sentrozoma tutunmamıştır. Bunun yerine sinir hücrelerindeki mikrotübüller sentrozomdan çıkar ve hem artı hem eksi uçları başlık proteinleri tarafından kararlı hale getirilerek sitoplazmada sonlanır. Ayrıca mikrotübüller akson ve dendritlerde farklı MAP'lar ile bağlıdır. Aksonlarda, mikrotübüllerin hepsi diğer hücre tiplerindeki mikrotübüllerin genel yönlenimlerine benzer olarak, artı uçları ile hücre gövdesinden uzağa yönelmişlerdir. Dendritlerde mikrotübüller her iki tarafa da yönlenmiştir, bazı artı uçlar hücre gövdesi, bazıları hücre kenarı doğrultusundadır. Mikrotübül yapılanmasındaki bu fark ile, MAP'lardaki farklılıklar paraleldir: Aksonlarda tau proteinleri bulunurken MAP-2 bulunmaz, dendritlerde ise MAP-2 vardır ancak tau proteini bulunmaz. MAP-2 ve tau dağılımındaki bu farklılığın akson ve dendritlerdeki kararlı mikrotübüllerin farklı düzenlenmelerinden sorumlu oldukları düşünülmektedir.

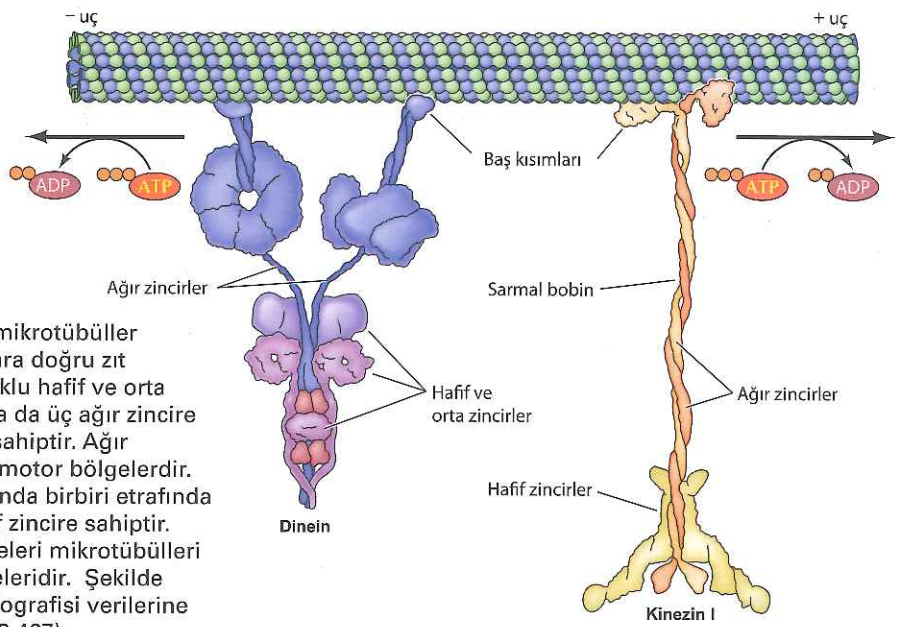
Animasyon 13.4
sites.sinauer.com/cooper7e/a13.4
Kinezin Kinezin, vezikülleri ve organelleri mikrotübüllerin artı uçlarına doğru hareket ettiren bir motor proteindir.

Mikrotübül Motorları ve Hareketleri

Mikrotübüller, hücre içinde zar veziküllerinin ve organellerin yer değiştirmesini, mitozda kromozomların ayrılmasını, sil ve kamçıların hareketini içeren çok çeşitli hücre hareketlerinden sorumludur. Bu, bölüm içinde önceki kısımlarda aktin filamanlarında da anlatıldığı gibi iki şekilde gerçekleşir: mikrotübüllerin polimerizasyonu ve depolimerizasyonu ile motor proteinlerin ATP hidrolizinden elde ettiği enerjiyi kullanarak güç ve hareket oluşturması. İki büyük motor protein ailesinin üyeleri olan **kinezinler** ve **dineinler,** mikrotübüllerin katıldığı çok çeşitli hareket için güç sağlamakla yükümlüdür.

Mikrotübül motor proteinleri

Mikrotübül motor proteinleri olan dinein ve kinezin, mikrotübül boyunca zıt yönlerde ilerler, çoğu dinein eksi uca kinezinler ise artı uca doğru hareket



Şekil 13.42 Mikrotübül motor proteinleri Dinein ve kinezin I, mikrotübüller üzerinde sırasıyla artı ve eksi uçlara doğru zıt yönlerde hareket eder. Dinein, çoklu hafif ve orta boydaki zincirlerle bağlantılı iki ya da üç ağır zincire (şekilde iki tanesi gösterilmiştir) sahiptir. Ağır zincirlerin globüler baş bölgeleri motor bölgelerdir. Kinezin I, helezonik sarmal yapısında birbiri etrafında dolanan iki ağır zincire ve iki hafif zincire sahiptir. Ağır zincirlerin globüler baş bölgeleri mikrotübülleri bağlar ve molekülün motor bölgeleridir. Şekilde gösterilen modeller X-ışını kristalografisi verilerine dayalıdır (R. D. Vale, 2003. *Cell* 113:467).

Anahtar Deney

Kinezin İzolasyonu

Identification of a Novel Force-Generating Protein, Kinesin, Involved in Microtubule-Based Motility

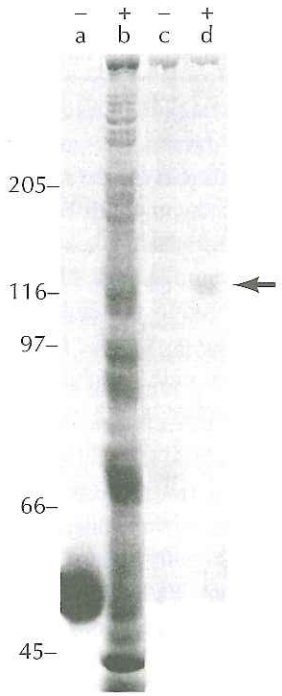
Ronald D.Vale, Thomas S. Reese, Michael P. Sheetz
National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA; University of Connecticut Health Çenter, Farmington, CT; Stanford University School of Medicine, Stanford, CA
Cell, Volume 42, 1985, pages 39-50

Bağlam

Ökaryot hücrelerin organizasyonu için sitoplazmik organellerin taşınması ve yerleşimi önemlidir. Bundan dolayı vezikül ve organel taşınmasından sorumlu mekanizmaların anlaşılması hücre biyolojisinin temel sorularından bir tanesidir. 1982 yılında, Robert Ailen, Scott Brady, Ray Lasek ve arkadaşları, *in vivo* ve hücreden bağımsız sistemlerde, dev kollu aksonlarda sitoplazmik filamanlar boyunca organellerin hareketini gözlemek amacıyla, video ile desteklenmiş mikroskop kullandılar. Bu filamanlar daha sonra, elektron mikroskopisi ile mikrotübül olarak tanımlandı, ancak organel hareketinden sorumlu olan motor proteinler bilinmiyordu. O zamanlarda tanımlanan tek mikrotübül motoru, silleri ve kamçılarda bulunan aksonemal dineindi. Ronal Vale, Thomas Reese ve Michael Sheetz 1985'te, mikrotübüller boyunca organellerin hareketinden sorumlu yeni bir motor protein olan kinezinin izolasyonunu tanımladılar. Aynı dönemde Scott Brady tarafından, benzer deneyler bildirildi (*Nature*, 1985, 317:73-75).

Deneyler

Kinezinin eldesinde iki deneysel strateji önemliydi. Birincisi, Allen ve arkadaşlarının çalışmalarına dayalı olan ve motor protein aktivitesinin saptanabileceği *in vitro* bir sistemin kullanımıydı. Vale, Reese ve Sheetz ise, aksonların sitoplazmasında bulunan proteinlerde mikrotübüllerin cam lamellerin yüzeyinde hareketi için gerekli gücün olduğunu buldukları bir sistem kullandılar. Bu hücresiz sistem bir moleküler motor olarak kinezinin aktivitesinin ölçümünde duyarlı ve hızlı fonksiyonel analiz sağlamaktaydı.



Bir motor proteinin AMP-PNP varlığında mikrotübüllere bağlanması
Protein örnekleri poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz edildi, boyandı ve fotoğraflandı. Moleküler ağırlık belirteç proteini kilodalton olarak solda görülmektedir. b kuyusu birçok farklı polipeptid içeren mürekkepbalığı akson sitoplazmasının çözünebilir bir özütüdür. Bu çözünebilir özüt mikrotübüller ile AMP-PNP yokken (kuyu c) veya AMP-PNP (kuyu d) varken inkübe edildi. Daha sonra mikrotübüller elde edildi, bağlı proteinlerin salınımı için ATP ile inkübe edildi ve elektroforeze yüklendi. 110-kd'luk polipetid (ok) AMP-PNP varlığında mikrotübüllere spesifik olarak bağlandı ve daha sonra ATP ile serbest bırakıldı. AMP-PNP varlığında bağlanan ve ATP varlığında serbest bırakılan proteinlerin aynı zamanda mikrotübül hareketini de uyardığı bulundu (jelin üstünde "+" olarak gösterilmiştir).

T.S. Reese

M.P. Sheetz

R.D. Vale

Kinezinin eldesinde kullanılan ikinci önemli yaklaşım, proteinin mikrotübüllere bağlanma özelliğinden yararlanmaktı. Lasek ve Brady (*Nature*, 1985, 316: 645-647), mikrotübüllerin *in vitro* hareketinin ATP'ye gereksinim duyduğunu ve bunun ATP analoğu (adenilil imidodifosfat, AMP-PNP) ile inhibe edildiğini gösterdiler. AMP-PNP varlığında, organeller mikrotübüllere bağlı kaldılar ve bu durum organel hareketinden sorumlu olan motor proteinlerin de mikrotübüllere bağlı kalmış olabileceğini desteklemekteydi.

Bu bulgulara dayanarak Vale ve arkadaşları, AMP-PNP varlığında mikrotübüller ile akson kollarından elde edilen sitoplazmik proteinleri inkübe ettiler. Daha sonra mikrotübüller elde edildi ve hidrolize edilemeyen ATP analoğu varlığında, spesifik olarak bağlanan proteinlerin salimini için ATP ile inkübe edildi. Bu deneyde AMP-PNP varlığında mikrotübüllere bağlanan ve ATP varlığında inkübe edildiğinde serbest kalan 110 kd'luk bir polipeptid tanımlandı (şekil). Bunun ötesinde mikrotübüllere bağlanıp ATP tarafından serbest bırakılan proteinlerin *in vitro* koşullarda mikrotübüllerin hareketini desteklediği gösterildi. (sonraki sayfada devam edilmiştir)

Anahtar Deney

Bu nedenle, AMP-PNP varlığında mikrotübüllere bağlanma, motor proteinlerin izolasyonunda etkin bir yaklaşım sağlamaktaydı. Daha sonra gerçekleştirilen biyokimyasal çalışmalar ise, 110 kd'luk polipeptidin 60-70 kd ağırlığındaki polipeptidlerle kompleks yaptığını gösterdi. Benzer bir yaklaşım ile, sığır beyninden de ilişkili başka bir protein saflaştırıldı. Yazarlar bu proteinlerin yapısal ve enzimatik olarak dineinden farklı yeni bir grup hareket proteinini temsil ettiğini bildirip bu yer değiştiricilerin kinezin (Yunanca'da *kinein*, hareket etmekten gelmektedir) olarak adlandırılmasını önerdiler.

Etki

Vezikül ve organellerin mikrotübüller üzerinde hareketi, ökaryotik hücrenin organizasyonu bakımından önemlidir. Bu nedenden dolayı, bu tip hareketlerden sorumlu olan motor proteinler hücre biyolojisinde kritik roller üstlenmektedir. Burada tanımlanan deneylere benzer şekilde gerçekleştirilen sonraki deneylerde, kinezinin mikrotübül boyunca (+) uç yönünde hareket ettiği ve dineinin vezikül ve organellerin mikrotübülün (-) ucu yönündeki hareketinden sorumlu olduğu gözlendi. Bunun ötesinde, kinezin ilişkili geniş bir protein ailesi tanımlandı. Vezikül ve organel taşımasındaki rollerinin yanı sıra, bu motor protein ailesinin üyeleri, mitoz sırasında kromozomların ayrılması ve dağılmasından sorumludur. Bu nedenle kinezinin tanımlanması ökaryot hücrelerin yapı ve fonksiyonu için önemli olan, mikrotübüle dayalı hareketlerin anlaşılmasında kolaylık sağlamıştır.

eder (Şekil 13.42). Mikrotübül motor proteinlerinden ilk tanımlanan, 1965'de Ian Gibbons tarafından izole edilen dineindir. Kirpiklerde bu tip dineinin (**aksonemal dinein** olarak adlandırılır) çok yüksek miktarda bulunması, aynen kas hücrelerinde miyozin baskın olduğu için elde edilmesinin kolaylaşması gibi, saflaştırılmasını kolaylaştırmıştır. Ancak, diğer mikrotübül-temelli motorların tanımlanması, kromozom hareketi ve organel taşınması gibi olaylardan sorumlu proteinlerin izolasyonu, sitoplazmada göreli olarak daha düşük konsantrasyonlarda bulunduğu için problemli olmuştur. Bu nedenle, bu proteinlerin elde edilebilmesi, moleküler motorların hareketlerini hücresiz sistemlerde saptayabilen yeni deneysel yöntemlerin gelişmesine bağlıdır.

Sitoplazmadaki motor proteinler için *in vitro* ölçüm yöntemleri geliştirilmesi, 1980'lerin başlarında Robert Allen ve Shinya Inoué tarafından, mürekkepbalığına ait aksonlarda zar vezikülleri ve organellerin mikrotübüller boyunca hareketini araştırmak için geliştirilen **video ile güçlendirilmiş mikroskobun** kullanılması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde ışık mikroskobu ile elde edilen görüntülerin kontrastını artırmak için bir video kamera kullanılmış, böylece küçük cisimlerin saptanmasında ve canlı hücrelerin izlenmesi ile organel hareketlerinin belirlenmesinde önemli gelişme sağlanmıştır. Bu yöntemi kullanarak, Allen, Scott Brady ve Ray Lasek 1982 yılında, plazma zarının uzaklaştırıldığı ve sitoplazma içeriğinin bir cam lam üzerine yayıldığı, hücresiz sistemlerde de, organel hareketlerinin gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bu gözlem, *in vitro* yeniden kurulan sistemlerin geliştirilmesine öncülük yapmıştır ve organel hareketlerinden sorumlu hücresel proteinleri saptayabilecek kapasitede bir ölçüm geliştirilmesi sağlamıştır. Brady ile birlikte, Ronald Vale, Thomas Reese ve Michael Sheetz 1985'de bu gelişmelerden yararlanarak, hem mürekkepbalığı aksonlarında hem de sığır beyninde bulunan yeni bir mikrotübül motor proteini olan kinezinleri tanımlamışlardır (günümüzde "geleneksel" kinezinler ya da kinezin I olarak bilinir).

Daha sonraki çalışmalar kinezin I'in, mikrotübül boyunca yalnızca bir yöne, artı uca doğru, yer değiştirdiğini göstermiştir. Aksonlardaki mikrotübüllerin artı uçları, hücre gövdesinden uzağa doğru yönlendikleri için (bkz. Şekil 13.41), kinezin I'in bu doğrultudaki hareketleri ile veziküller ve organeller hücre gövdesinden uzağa, aksonların uçlarına doğru taşınır. Bununla birlikte sağlam aksonlarda veziküller ve organellerin geriye, hücre gövdesine doğru hareket

ettikleri gözlenmiştir, bu da mikrotübüller boyunca karşıt yöne-eksi uca doğru, hareketten sorumlu, farklı bir motor proteinin olabileceğini düşündürmüştür. Bu öngörüye uygun olarak, daha sonraki deneyler, daha önceleri silden elde edilmiş dineine (aksonemal dinein) benzeyen mikrotübül-bağlayan protein olarak tanımlanmış bir proteinin, aslında mikrotübüllerin eksi ucu yönünde hareket eden motor protein olduğunu göstermiştir. Bu protein günümüzde **sitoplazmik dinein** olarak bilinmektedir.

Kinezin I, yaklaşık 380 kd'luk, iki ağır zincir (her biri 120 kd) ve iki hafif zinciri (her biri 64 kd) olan bir proteindir (bkz. Şekil 13.42). Ağır zincirlerde uzun α-sarmal bölgeleri, birbirlerinin üzerine dolanan-sarmal yapısındadır. Ağır zincirlerdeki amino ucu globüler baş bölümleri, molekülün motor bölgeleridir. Hem mikrotübüllere hem de ATP'ye bağlanır ve ATP hidrolizi ile, hareket için gerekli enerjiyi sağlar. Kinezinin motor bölümü (yaklaşık 340 amino asit) miyozininkinden (850 amino asit kadar) çok daha küçük olsa da, X-ışını kristallografisi kinezin ve miyozinin yapısal olarak ilişkili olduklarını ve kuvvet ve hareket üretmek için benzer bir moleküler mekanizma kullandıklarını göstermektedir. Kinezin molekülünün kuyruk kısmı, ağır zincirin karboksi uç bölgesi ile bağlanmış hafif zincirler içerir. Kinezinin bu bölgesi kinezin motorunun etkisi ile, mikrotübül boyunca taşınacak diğer hücresel elemanlara (zar vezikülleri ve organeller gibi) bağlanmadan sorumludur.

Miyozinler gibi, kinezinler de ilintili motor protein aileleri oluşturur. *C. elegans* genomunda onsekiz farklı kinezin kodlanmaktadır, insanda ise bilinen 45 kinezin vardır. Kinezin ailesinin çoğu üyesi, kinezin I gibi, mikrotübüllerde artı uç yönünde hareket eder. Buna karşın, kinezin ailesinin diğer bazı üyeleri ise, karşıt yönde, eksi uca doğru ilerler ve bazı kinezinler mikrotübüller boyunca hiç hareket etmez ancak mikrotübül depolimerize edici proteinler olarak etki gösterir. Molekülde motor proteininin nerede olduğu ile mikrotübül boyunca hareket yönü arasında doğrudan bir ilişki vardır. Artı uca yönlendiren kinezinler amino ucu motor birimlerine sahipken eksi uca yönlendiren kinezinler karboksi ucu motor birimlerine sahiptir. Mikrotübüller boyunca hareket etmeyip onları depolimerize eden kinezinlerin motor birimleri ise ağır zincirlerinin ortasında (orta motor kinezinleri) yer alır. Kinezin ailesinin bu farklı üyelerinin karboksi ucundaki kuyruklarının dizilimleri değişkendir ve farklı tipteki kargoların mikrotübül boyunca hareketlerinden sorumludur.

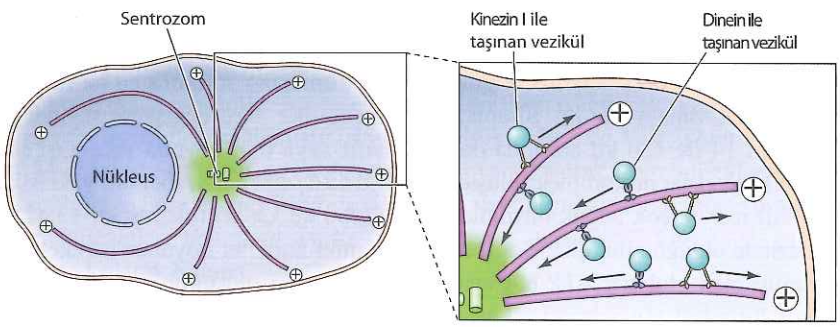
Sillerin hareketinden sorumlu birkaç tür aksonemal dinein ve kargoları mikrotübüllerin eksi uçlarına doğru hareket ettirmekten sorumlu en az iki tip sitoplazmik dinein vardır. Sitoplazmik dinein, her biri değişken sayıdaki, boyutları 14 ile 120 kd arasında değişen, hafif veya orta boyutta ve değişken sayıdaki zincirler ile kompleks oluşturan, iki ya da üç ağır zincir (her biri yaklaşık 500 kd) içeren, çok büyük bir moleküldür (2000 kd kadar) (bkz. Şekil 13.42). Kinezinde olduğu gibi, dinein ağır zincirleri, mikrotübüller boyunca hareketten sorumlu olan globüler ATP-bağlayan motor bölgeleri oluşturur. Ancak dinein motor birimleri miyozinin ve kinezininkilere benzemez ve bir motor protein olarak dinein etkisinin moleküler mekanizması daha az anlaşılmıştır. Sitoplazmik dineinin hafif ve orta zincirleri de içeren bazal kısmı, organeller ve veziküller gibi diğer hücre içi yapılara bağlanır. Farklı kargoları taşıyan birkaç çeşit hafif ve orta zincir bulunmaktadır. Belirli dineinlerin ve kinezinlerin farklı mikrotübülleri, tübülinin post-tanslasyonel değişiklikleri nedeniyle tanıdıkları düşünülmektedir.

Video 13.4
sites.sinauer.com/cooper7e/v13.4
Mikrotübüller Boyunca Vezikül-Hareketi Veziküller sitoplazmada mikrotübüller boyunca kinezin ve dinein tarafından taşınır.

Kargo taşınması ve hücre içi düzenlenme

Mikrotübüllerin esas rollerinden birisi, aktin filamanlar gibi, makromolekülleri, zar veziküllerini ve organelleri ökaryot hücrelerin sitoplazmaları boyunca taşımaktır. Daha önce de tartışıldığı gibi, bu gibi sitoplazmik organel taşınmaları, özellikle sinir hücrelerinin bir metreden daha çok uzayabilen aksonlarında kanıtlanmıştır. Organeller ile protein ve RNA içeren zar vezikülleri hücre gövdesinden aksonlara taşınmalıdır. Video ile güçlendirilmiş mikroskopi yoluyla, zar veziküllerinin ve organellerin akson mikrotübülleri boyunca, her iki yönde de taşındığı görüntülenebilir, burada kinezin ve dinein, sırasıyla, aksonların uçlarına ve uçlarından kendi yüklerini taşır. Örneğin, nörotransmiterleri içeren salgı vezikülleri, Golgi aygıtından aksonların uç dallarına kinezin ile taşınır. Ters yönde, sitoplazmik dinein, endositik vezikülleri aksondan hücre gövdesine taşır. Diğer hücre tiplerinde de mikrotübüller makromolekülleri, zar veziküllerini ve organelleri benzer şekilde taşır.

Mikrotübüller sentrozomlara eksi uçları ile tutunarak, artı uçları hücre kenarına doğru yönlendiğinden, kinezin ailesinin farklı üyeleri ve sitoplazmik dinein kargoları sitoplazma boyunca zıt yönlere taşır (**Şekil 13.43**). Kinezin I ve diğer artı uca yönlendiren kinezin ailesi üyeleri, kargolarını hücre kenarına doğru taşırken, sitoplazmik dineinler ve eksi uca yönlendiren kinezin ailesi üyeleri materyalleri hücrenin merkezine doğru taşır. Kargo seçimi çok özelleşmiş olabilir. Artı uca yönlendiren bir motor olan kinezin II, *Xenopus* oositlerinde seçilmiş mRNA'ları hücre korteksine doğru taşır ve bu sürecin tüm omurgalılarda genel olarak işlediği düşünülmektedir. Benzer şekilde kinezin I de fibroblastlarda aktin mRNA'sını ve dinein de *Drosophila* embriyosunda belirli mRNA'ları bir tarafa doğru taşır. Belirli dineinlerin ve kinezinlerin farklı mikrotübülleri, tübülinin post-translasyonel değişiklikleri nedeniyle tanıdıkları düşünülmektedir. Ayrıca moleküler motorların bazı türleri bir kargo ile aynı zamanda birleşerek kargonun düzgün konumlanmasını sağlar. Örneğin, artı uca yönlendiren kinezin, eksi uca yönlendiren kinezin ve belki bir dinein ya da miyozin aynı veziküle bağlanarak vezikülün mikrotübüller ya da aktin filamanları boyunca değişen yönlerde taşınmasına izin verir. Gelecekte çözülmesi gereken bir sorun farklı motorlar arasında değişiklik yaparak taşınmanın nasıl kontrol edildiğidir.

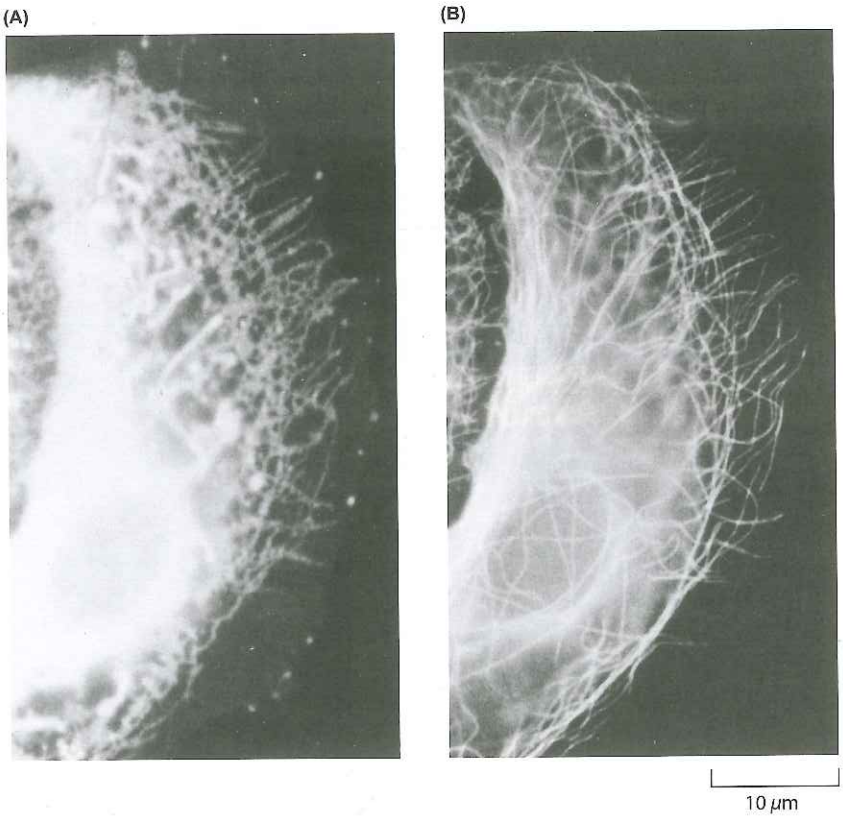


Şekil 13.43 Mikrotübüller boyunca veziküllerin iletimi Kinezin I ve kinezin ailesinin artı uca yönelen diğer üyeleri, hücre çevresine doğru çıkıntı yapan mikrotübülün artı uçları yönünde vezikül ve organelleri taşır. Bunun tersine, dinein ve kinezin ailesinin eksi uca yönelen üyeleri, hücrenin merkezinde bulunan mikrotübülün eksi uçları yönünde kargolarını taşır.

Endositik ve salgısal yolaklardaki zar veziküllerinin taşınmasına ek olarak, mikrotübüller ve ilişkili motor proteinler, zarla kaplı organelleri (endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, lizozomlar ve mitokondri gibi) hücre içerisinde konumlandırır. Örneğin endoplazmik retikulum, mikrotübüllere bağlanarak hücre kenarına doğru uzanır (Şekil 13.44). Mikrotübülleri depolimerize eden ilaçlar, endoplazmik retikulumun hücre merkezine doğru gerilemesine neden olur. Bu durum, endoplazmik retikulumun yaygın durumunun korunması için mikrotübüller ile bağlanmasının gerekli olduğunu göstermektedir. Endoplazmik retikulumun hücredeki yerleşiminde, onu mikrotübüller boyunca hücre kenarına doğru artı uç yönünde çeken kinezinin (ya da olasılıkla kinezin ailesinin birçok üyesinin) etkili olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde, kinezinin, lizozomların hücre merkezinden uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynayabileceği ve kinezin ailesinin üç değişik üyesinin mitokondri hareketinde görev aldığı gösterilmiştir.

Video 13.5
sites.sinauer.com/cooper7e/v13.5
Mitokondriyal Hareket Mikrotübüller ve ilişkili motor proteinleri hücre içinde mitokondrileri hareket ettirir.

Bunun aksine, sitoplazmik dineinin, Golgi aygıtının yerleşiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Golgi aygıtı, sentrozom yakınında hücrenin ortasında yerleşiktir. Eğer mikrotübüller, ilaçla ya da hücre mitoza girdiğinde



Şekil 13.44 Endoplazmik retikulumun mikrotübüller ile bağlantısı Epitel hücrede bulunan endoplazmik retikulumun (A) ve mikrotübüllerin (B) floresan mikroskopisi. Endoplazmik retikulum floresan bir boya ile ve mikrotübüller tübüline spesifik bir antikor ile boyalıdır. Hücre çeperinde endoplazmik retikulum ve mikrotübüllerin yakın ilişkisine dikkat ediniz (M. Terasaki, L.B. Chen ve K. Fujiwara, 1986. *J. Cell Biol.* 103: 1557).

yıkılırsa, Golgi, sitoplazma geneline yayılan küçük veziküllere ayrılır. Mikrotübüller yeniden oluştuğunda, Golgi vezikülleri, sitoplazmik dinein aracılıyla hücrenin merkezine (mikrotübüllerin eksi ucuna doğru) taşınır ve Golgi aygıtı yeniden yapılanır. Bu nedenle, ökaryot hücrelerin sitoplazmalarında gözlenen mikrotübüller boyunca hareket, sadece vezikül taşımasından değil zarla çevrili organellerin yerleşiminden de sorumludur.

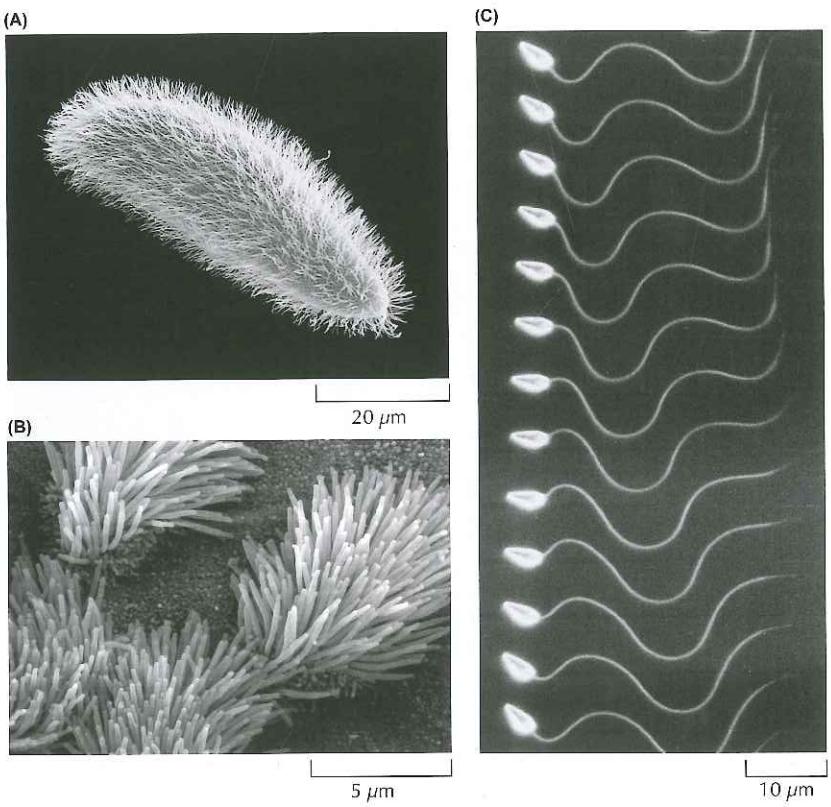
Sil ve kamçılar

Siller ve **kamçılar,** çeşitli ökaryot hücrenin hareketinden sorumlu olan, plazma zarının mikrotübül temelli uzantılarıdır. Siller daha yaygın olup hemen hemen tüm hayvan hücrelerinde bulunur. Birçok bakteride de kamçılar bulunmaktadır, fakat bu prokaryot kamçıları ökaryotlardakilerden oldukça farklıdır. Bakteri kamçıları (burada daha fazla tartışılmayacaktır) mikrotübül destekli plazma zarı uzantıları değil, hücre yüzeyinden dışarıya doğru uzanan protein filamanlarıdır.

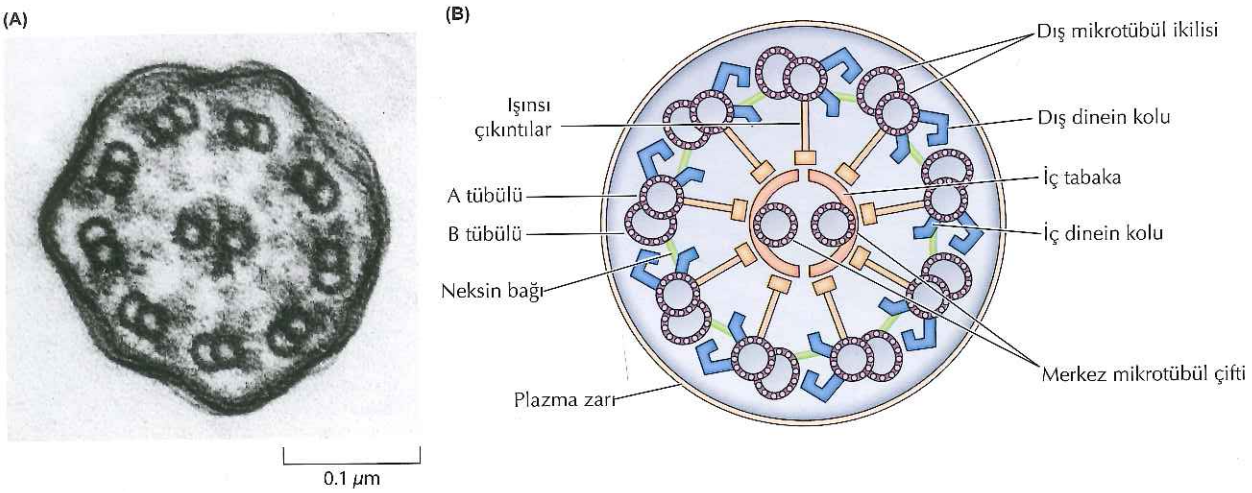
Video 13.6
sites.sinauer.com/cooper7e/v13.6
Kirpik Hareketi Kirpikler bazı protozoaların yüzeyini kaplar ve hücre hareketinden ve besinleri ağız boşluğuna yönlendirmekten sorumludur.

Ökaryotlardaki sil ve kamçılar her biri yaklaşık 0.25 μm çapa sahip, birbirine çok benzer yapılardır (**Şekil 13.45**). Birçok hücre, uzunluğu yaklaşık

Video 13.7
sites.sinauer.com/cooper7e/v13.7
***Öglenada* Kamçı** Kamçılar pek çok çeşit protozoa ve sperm tarafından hareket için kullanılır.



Şekil 13.45 Sil ve kamçı örnekleri (A) *Paramecium*'un yüzeyini kaplayan çok sayıda kirpiği gösteren tarayıcı elektron mikrografı. (B) Trake yüzeyini kaplayan kirpikli epitel hücrelerinin tarayıcı elektron mikrografı (C) Deniz kestanesi sperm kamçısının dalga benzeri hareketini gösteren çoklu flaş (500 flaş/saniye) fotoğrafı (C, C. J. Brokaw'in izniyle, California Institute of Technology).



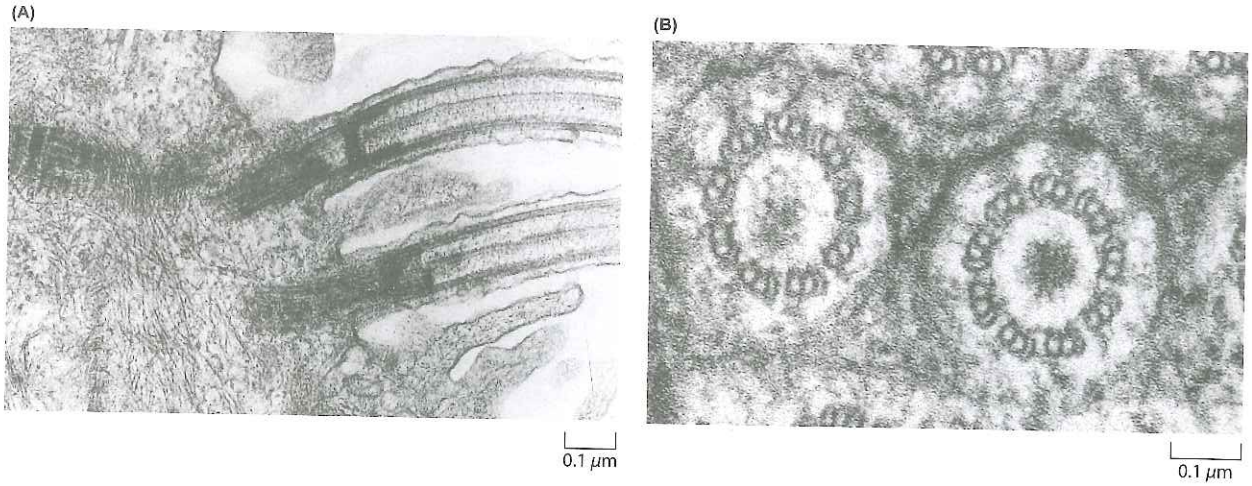
Şekil 13.46 Sil ve kamçının aksonem yapısı (A) Sıçan sperm kamçısının aksoneminin enine kesitinin bilgisayar destekli elektron mikroskobu mikrografı. (B) Aksonemin şematik enine kesiti. Dışarı doğru yerleşik olan dokuz adet ikili,13 adet önfilaman içeren bir tam A tübülü ve 10 ya da 11 önfilaman içeren bir tam olmayan B tübülü içerir. Dış ikililer birbirleriyle neksinler aracılığıyla ve merkezdeki mikrotübül çiftine ışınsı çıkıntılar aracılığıyla bağlanır. Dışarı doğru yerleşik olan bu mikrotübül çiftlerinin her biri iç ve dış dinenin kolları ile ilişkilidir.

Video 13.8
sites.sinauer.com/cooper7e/v13.8
Koordine Sil Hareketi Hayvanlarda silin koordine hareketi sıvı ya da mukusu bir yüzeyde hareket ettirebilir.

10 μm olan çok sayıda sil (kirpik) ile kaplıdır. Siller düzenli bir şekilde ileri-geri hareketleri yaparak, titreşerek, hücreyi sıvı içerisinde ya da sıvıyı hücre yüzeyinde hareket ettirir. Örneğin, *Paramesyum* gibi bazı protozoanın silleri, hem hücre hareketinden, hem de besin organizmalarının hücre yüzeyine ve ağız boşluğu içine alınmasından sorumludur. Hayvanlarda, sillerin önemli bir fonksiyonu da, sıvıyı ya da mukusu, epitel hücre tabakalarının yüzeyinde hareket ettirmektir. Buna iyi bir örnek, solunum yollarını döşeyen ve solunum yollarından mukus ve tozları uzaklaştıran silli hücrelerdir. Kamçılar 200 μm'ye varabilen uzunlukları ve dalga benzeri titreşme hareketleri bakımından sillerden farklıdır. Hücreler genellikle çeşitli protozoanın ve spermlerin hareketinden sorumlu olan sadece bir ya da iki kamçı içermektedir.

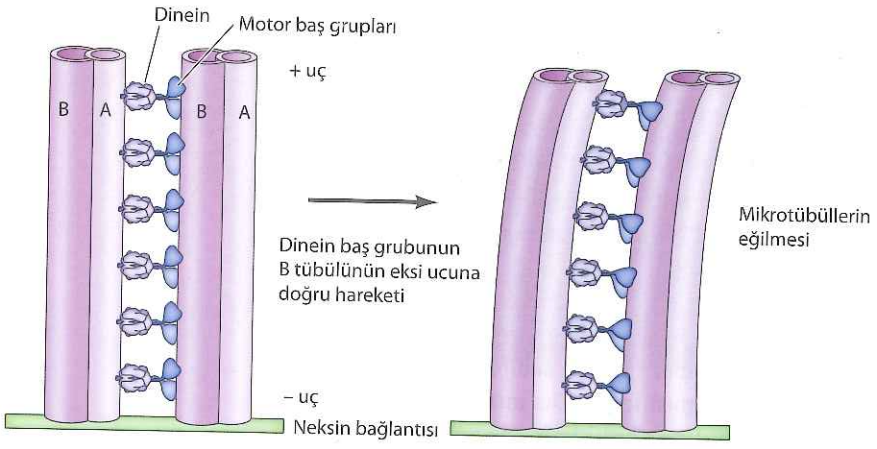
Hem sil hem de kamçının temel yapısı, mikrotübüller ve ilişkili proteinlerinden oluşan **aksonemdir** (Şekil 13.46). Mikrotübüller, dokuz çift dış mikrotübül ile çevrili bir çift merkez mikrotübülünden oluşan "9+2" formatında düzenlenmiştir. Dışta bulunan birbirine kaynaşmış her ikili farklıdır: bunlardan biri (A tübülü adı verilen) 13 önfilamana sahip olan tam bir mikrotübüldür; diğeri ise (B tübülü) tam bir mikrotübül yapısına sahip değildir ve A tübülüne kaynaşmış halde 10 ya da 11 önfilaman içerir. Dış mikrotübül çiftleri merkezdeki mikrotübül çiftine ışınsı çıkıntılar ve birbirlerine de **neksin** adı verilen bağlantılar aracılığıyla bağlıdır. Buna ek olarak, her bir A tübülüne, iki dinein kolu tutunmuştur, bu aksonemal dineinlerin motor aktiviteleri sil ve kamçının titreşme hareketini sağlar.

Sil ve kamçıların yapısında bulunan mikrotübüllerin eksi uçları, dokuz adet mikrotübül üçlüsü içeren ve **bazal cisim** adı verilen sentriyol içinde tutunmuştur



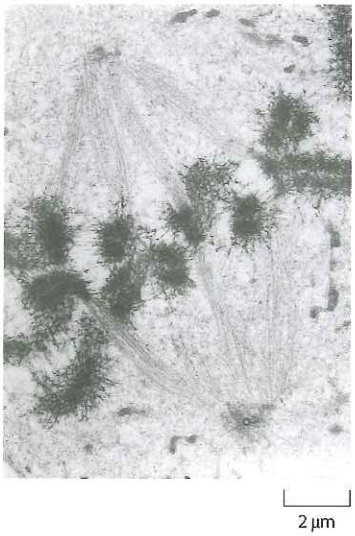
Şekil 13.47 Bazal cisimlerin elektron mikroskop fotoğrafları (A) Bazal cisimlere tutunan sillerin uzunlamasına görünüşü. (B) Bazal cisimlerin enine kesiti. Her bir bazal cisim, dokuz mikrotübül üçlüsüne sahiptir.

(Şekil 13.47). Sentrozom elemanları olarak önceden bahsedilmiş olan sentriyoller, bu yapı içerisinde kompleks ve iyi anlaşılamamış bir işleve sahiptir. Bununla birlikte, bazal cisimler, aksonem mikrotübüllerinin düzenlenmesinde açık bir role sahiptir. Aksonemin dışındaki mikrotübül çiftlerinin her biri, bazal cismin içindeki üçlülerde bulunan iki mikrotübülün uzamasıyla gelişir. Bu bakımdan bazal cisimler, sil ve kamçıyı hücre yüzeyinde tutmanın yanı sıra, aksonemal mikrotübüllerin uzamasını başlatmakla da görevlidir.



Şekil 13.48 Sil ve kamçı içerisindeki mikrotübüllerin hareketi Dinein kollarının alt bölümleri A tübüllerine bağlıdır ve motor baş grupları yanlardaki B tübülleri ile etkileşir. Dinein baş gruplarının eksi uç yönündeki (silin aşağısına doğru) hareketi, bir çiftteki A tübülünün yandaki B tübülünün aşağısına doğru kaymasına neden olur. Her iki mikrotübül çifti, neksin bağıyla bağlantılı olduğundan kayma hareketi eğilmelerine yol açar.

Sil ve kamçıların hareketleri, dıştaki mikrotübül çiftlerinin birbirine göreli olarak kaymasının sonucudur ve bu aksonemal dineinin motor aktivitesi ile desteklenir (Şekil 13.48). Dineinin alt kısmı A tübülüne bağlanırken, dinein baş grupları komşu mikrotübül çiftlerinin B tübüllerine bağlanır. Böylece, dinein baş gruplarının eksi uç yönündeki hareketi, bir çift içindeki A tübülünün, komşu B tübülünün alt ucuna doğru kaymasına yol açar. Aksonemdeki mikrotübül çiftleri neksin köprüleri ile bağlı olduğundan, bir çiftin diğeri üzerinde kayması bükülmelerine neden olur. Bu da sil ve kamçının titreşim hareketinin esasını oluşturmaktadır. Buna karşın, aksonemin farklı



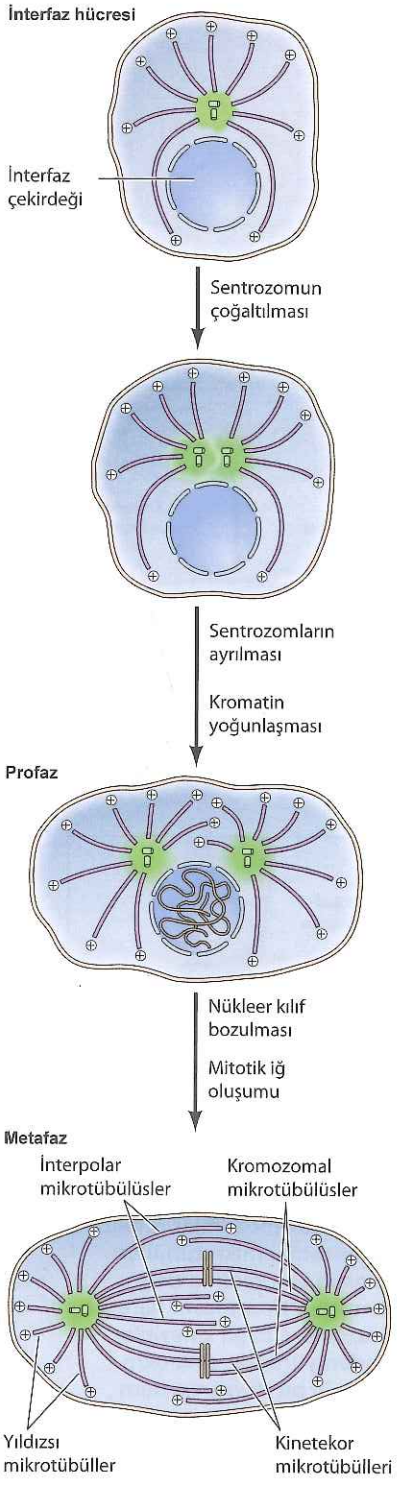
Şekil 13.49 Mitotik iğin elektron mikrografı İğ mikrotübülleri yoğunlaşmış kromozomlara metafaz plağında tutunur.

bölgelerindeki dinein moleküllerinin aktiviteleri, sillerin titreşimlerinin ve kamçının şu ana kadar çok az anlaşılan dalga benzeri hareketlerinin düzenli olarak gerçekleştirilebilmesi için çok dikkatli bir şekilde kontrol edilmelidir.

Mikrotübüllerin mitoz sırasında yeniden düzenlenmesi

Daha önce de belirtildiği gibi, mikrotübüller mitoz sırasında tamamen yeniden organize olarak dinamik kararsızlıkların öneminin dramatik bir örneğini verirler. Mitoz sırasında dinamik kararsızlık, mikrotübül yıkımı ve büyümesindeki artış nedeniyle hızlanır. Böylelikle, interfaz hücrelerinde bulunan mikrotübül dizisi dağılır ve serbest kalan tübülin parçacıkları, yavru kromozomların ayrılmasından sorumlu olan **mitotik iği** oluşturmak üzere birleştirilir (Şekil 13.49). Mikrotübül hücre iskeletinin bu yeniden yapılanması, mitotik iğin zıt kutuplarında bulunan iki ayrı mikrotübül organize edici merkezi oluşturmak için sentrozom duplikasyonu tarafından yönlendirilir.

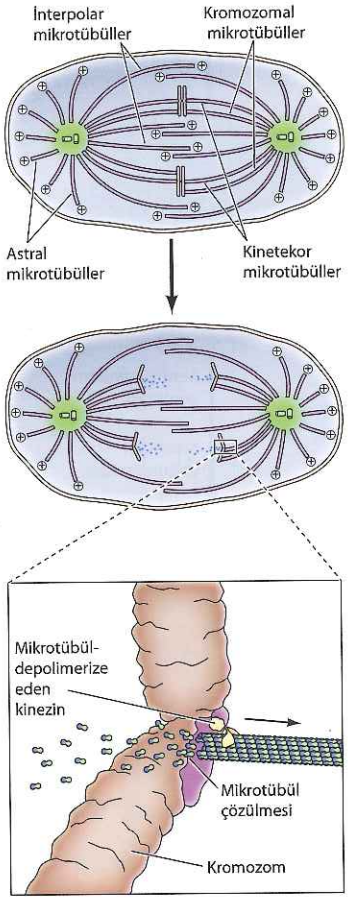
Sentriyoller ve sentrozomun diğer bileşenleri interfaz hücrelerinde kopyalanır, ancak mitozun başlangıcına dek nükleusun bir tarafında bir arada kalır (Şekil 13.50). İki sentrozom daha sonra ayrılır ve nükleusun zıt yönlerine doğru hareket ederek mitotik iğin iki kutbunu



Şekil 13.50 Mitotik iğin oluşumu Sentriyoller ve sentrozomlar interfazda ikilenir. Mitozun profaz aşamasında ikilenen sentrozomlar ayrılır ve nükleusun zıt bölgelerine doğru hareket eder. Bu aşamada nükleer zarf çözülür, mikrotübüller mitotik iği oluştumak üzere yeniden organize olur. Kinetokor mikrotübülleri, yoğunlaşmış olan kromozomların kinetokorlarına tutunur ve uçlarında kromozomal mikrotübüllere bağlanır. İnterpolar mikrotübüller birbirleriyle hücrenin ortasında üst üste çakışır ve yıldızsı mikrotübüller hücre çevresinden dışarıya doğru uzanır. Metafazda yoğunlaşmış kromozomlar iğin merkezinde dizilir.

oluşturur. Hücre mitoza girerken, mikrotübül birleşme ve dağılma dinamikleri de önemli ölçüde değişir. İlk olarak, mikrotübül dağılma oranı yaklaşık on kat artarak genel depolimerizasyona ve mikrotübül büzülmesine neden olur. Aynı zamanda, sentrozomdan yayılan mikrotübüllerin sayısı beş ila on kat artar. Bu değişiklikler, kombinasyon halinde, interfaz mikrotübüllerinin dağılmasına ve sentrozomdan çok sayıda kısa mikrotübülün büyümesine neden olur.

İlk olarak Marc Kirschner ve Tim Mitchison tarafından 1986 yılında önerildiği gibi, mitotik iğ oluşumu sentrozomlardan yayılan mikrotübüllerin bazılarının seçici olarak stabilizasyonu ile gerçekleşir. Bu mikrotübüller dört tiptir ve bunlardan üçü mitotik iği oluşturur. **Kinetokor mikrotübülleri**, mitotik hücrelerdeki yoğunlaşmış kromozomlara, özgün proteinler ile birleşerek kinetokoru oluşturan sentromerlerinden tutunur (bkz. Şekil 6.24). Kinetokora bağlanma bu mikrotübüllerin artı uçlarını stabilize eder, ve bu da daha sonra tartışılacağı gibi, mitotik kromozomların ayrılmasında kritik bir rol oynar. **Kromozomal mikrotübüller**, yine sentrozomlardan yayılır ve kromozom uçlarını kromokinezine bağlar. Mitotik iğde bulunan mikrotübüllerin üçüncü tipi **(interpolar mikrotübüller)** kromozomlara tutunmaz. Bunun yerine, polar mikrotübüller iki sentrozomdan yayılarak hücre merkezinde birbirleri ile üstüste gelerek stabilize olur. **Yıldızsı mikrotübüller** sentrozomdan, serbest artı uçları hücre korteksine tutunacak şekilde hücrenin kenarına doğru uzarlar. Daha sonra da ele alınacağı gibi, hem polar hem de yıldızsı mikrotübüller, iğ zıt kutuplara iterek kromozom hareketine katkıda bulunur.



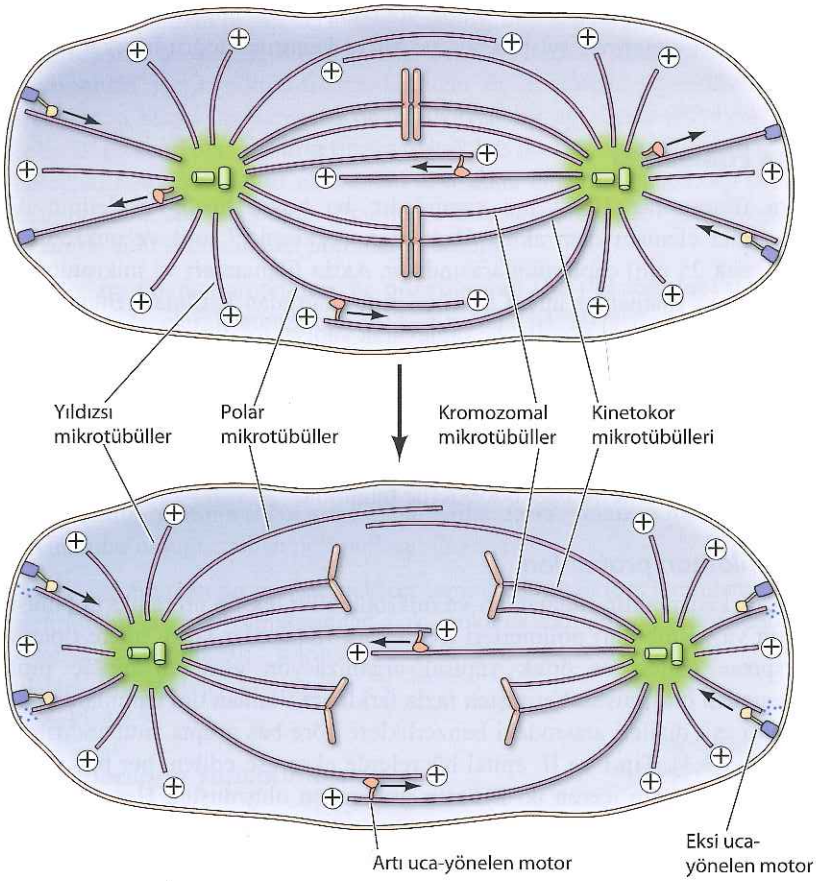
Şekil 13.51 Anafaz A kromozom hareketi Kromozomlar, kinetokor ve kromozomal mikrotübülleri boyunca iğ kutuplarına doğru hareket eder. Kromozom hareketi, kromozomlara bağlı kinezinler tarafından yürütülmekte olup, kinezinlerin bu davranışı hem kinetokor hem kromozomal mikrotübüllerin depolimerize olarak kısalmasında rol oynar.

Mitoz devam ederken, yoğunlaşmış kromozomlar öncelikle metafaz plağı üzerinde toplanır ve daha sonra, her kromozomun iki kromatidi iğin iki karşıt kutbuna çekilerek ayrılır. Kromozom hareketi, birazdan kısaca tartışılacağı gibi, iğ ve kromozomal mikrotübüller ile bağlantılı motor proteinleri tarafından gerçekleştirilir. Mitozun son döneminde, nükleer zarf yeniden oluşur, kromozomlar gevşer ve sitokinez gerçekleşir. Böylece, her yavru hücrede yeni interfaz mikrotübül ağ yapısının oluşumunu başlatacak bir sentrozom yer alır.

Kromozom hareketi

İki sentrozom mitoz başında hücrenin zıt taraflarına hareket ettikten sonra, kopyalanmış kromozomlar kinetokorlara ve kromozomal mikrotübüllere bağlanır ve metafaz plağında iki iğ kutbuna eşit uzaklıkta olacak şekilde hizalanır. Kromozomların hizalanması, kinetokor mikrotübüllerinin hızla büyümesi ve kinetokorların artı uca bağlanan proteinler tarafından yakalanması yoluyla kontrol edilir. Buna ek olarak, kromozom uçları, kromozomal mikrotübüller boyunca hareket eden kromokinezin tarafından metafaz plakasına doğru itilir. Tüm kromozomlar metafaz plağında hizalanınca, kardeş kromatitler arasındaki bağlar koparılır ve kardeş kromatidlerin ayrıldığı ve iğin zıt kutuplarına hareket ettiği anafaz başlar. Kromozom hareketi, farklı iğ mikrotübüllerini içeren anafaz A ve anafaz B olarak tanımlanan iki farklı mekanizma ile ilerler.

Anafaz A kromozomların, kromozom hareket ettikçe kısalan kinetokor ve kromozomal mikrotübüller boyunca iğ kutuplarına doğru hareketini içerir (Şekil 13.51). Kromozomların, iğ mikrotübülleri boyunca eksi ucu yönünde (sentrozomlara doğru) hareketi, mikrotübüllerin artı ucuna bağlı kromozomla birleşik kinezinler tarafından gerçekleştirilir. Bu kinezinler mikrotübül depolimerize edici enzimler olarak rol oynar ve kromozomlar



Şekil 13.52 Anafaz B'de iğ kutbunun ayrılması İğ kutuplarının ayrılması iki tip hareketten kaynaklanır. İlk olarak, üst üste çakışan polar mikrotübüller iğ kutbunu ayırmak üzere birbiri üzerinde kayar. Bu kayma, artı uca yönelen motor proteinlerin davranışının sonucudur. İkinci olarak, iğ kutupları, hücre korteksine tutunmuş eksi uca yönelen motorlar ile hareket ettirilen yıldızsı mikrotübüller tarafından çekilir.

iğin karşı kutuplarına hareket ettikçe hem kinetokoru ve hem de kromozomal mikrotübülleri dağıtıp kısaltır.

Anafaz B, iğ kutuplarının kendiliğinden ayrılmasını kapsar (Şekil 13.52). İğ-kutup ayrılması polar mikrotübüllerinin uzaması eşliğinde gerçekleşir ve mitozun başlangıcında kopyalanmış sentrozomların iğ kutuplarını oluşturmak üzere, ilk ayrışmasına benzemektedir (bkz. Şekil 13.50). Anafaz B sırasında, üst üste çakışan polar mikrotübüller, iğ kutuplarını iterek birbirlerinin üzerinde kayar. Bu hareket tipi, artı uca yönelen kinezinlerin etkisinden kaynaklanır. Bu kinezinler, polar mikrotübülleri çapraz bağlayarak, onları üst üste çakıştığı mikrotübülün artı ucuna doğru, karşıt iğ kutbundan uzağa hareket ettirir. Buna ek olarak, iğ kutupları, yıldızsı mikrotübüller tarafından birbirinden ayrılır. Bu tip bir hareket hücre korteksine tutunan sitoplazmik dineinin etkisini gerektirmektedir. Kortekse tutunmuş dineinin yıldızsı mikrotübüller boyunca eksi uç yönündeki hareketi, iğ kutuplarını hücre kenarına doğru çekerek birbirinden ayırır. Yıldızsı mikrotübüllerin depolimerazlar tarafından

Bilgi İçin

Ara filamanların fiziksel özellikleri yapısal destek sağlama rollerine çok uygundur. Ara filamanlar normalde çok sert değildir ancak yüksek strese maruz kalırsa sertleşip kırılmaya direnç gösterir.

eşzamanlı olarak kısalması, mitoz sonunda yavru hücrelerin oluşumundan önce, iğ kutuplarının ayrılmasına ve hücre kenarına doğru hareket etmesine neden olur.

Ara Filamanlar

Ara filamanlar 10-12 nm çapındadır, bu boyut hücre iskeletinin diğer iki temel elemanı olan aktin filamanları (yaklaşık 7 nm) ve mikrotübüller (yaklaşık 25 nm) çaplarının arasındadır. Aktin filamanları ve mikrotübüllerin tersine ara filamanlar hücre hareketlerine doğrudan katılmaz. Bunun yerine hücre ve dokulara mekanik güç sağlayarak yapısal rol oynar ve hücre içi sinyal iletimi dahil hücresel süreçlerin konumlanması için bir iskele görevi görür. Bazı bakteriler ökaryot ara filamanlarına benzer proteinlere sahiptir ve bu proteinler bakteriyel plazma zarının altında filamanlar halinde birleşir. Ancak sitoplazmik ara filamanlar çoğu çok hücreli hayvan için karakteristik olsa da, mayada, bitkilerde ve bazı böceklerde bulunmaz.

Ara filaman proteinleri

Her ne kadar, aktin filamanları ve mikrotübüller tek tip proteinlerin (sırasıyla aktin ya da tübülin) polimerleri ise de, ara filamanlar farklı hücre tiplerinde eksprese edilen ve ortak yapısal organizasyon gösteren birkaç protein ailesinden oluşmuştur.Yetmişten fazla farklı ara filaman tipi tanımlanmıştır ve amino asit dizileri arasındaki benzerliklere göre beş grupta sınıflandırılmıştır (Tablo 13.3). Tip I ve II, epitel hücrelerde eksprese edilen, her biri yaklaşık 15 farklı protein içeren iki **keratin** grubundan oluşmuştur. Her epitel hücre tipi, filamanlar oluşturmak üzere birlikte polimerleşen en az bir tip I (asidik) ve bir tip II (nötral/bazik) keratin sentezler. Keratin tip I ve II'nin bazı tipleri (sert keratinler) kıl, tırnak ve boynuz gibi yapıların üretilmesinde kullanılır. Keratin tip I ve II'nin bazı diğer çeşitleri (yumuşak keratinler) epitel hücrelerin sitoplazmalarında yoğun olarak bulunur ve çeşitli farklılaşmış hücre tiplerinde farklı keratinler eksprese edilir.

Tablo 13.3 Ara Filaman Proteinleri

Tip	Protein	Büyüklük (kd)	Ekspresyon bölgesi
I	Asidik keratinler	40-60	Epitel hücreler
II	Nötral veya bazik keratinler	50-70	Epitel hücreler
III	Vimentin	54	Fibroblastlar, akyuvarlar ve diğer hücre tipleri
	Desmin	53	Kas hücreleri
	Glia fibriler asidik protein	51	Glia hücreleri
	Periferin	57	Periferik nöronlar
IV	Nörofilaman proteinler		
	NF-L	67	Nöronlar
	NF-M	150	Nöronlar
	NF-H	200	Nöronlar
	α-interneksin	66	Nöronlar
	Nestin	200	Kök hücreler
V	Nükleer laminler	60-75	Tüm hücre çeşitlerinin nükleer laminası

Tip III ara filaman proteinleri, fibroblastları, düz kas hücrelerini ve beyaz kan hücrelerini de içeren birçok farklı çeşit hücrede bulunan bir protein olan **vimentin** içerir. Aktin filamanlarından farklı olarak, vimentin hücre çekirdeğinden hücre dış kenarına doğru uzayan bir ağ yapısı oluşturur. Bir diğer tip III proteini olan **desmin** özgün olarak kas hücrelerinde eksprese edilir ve buradaki farklı kasılabilir elemanları Z diskine bağlar. Üçüncü, tip III ara filaman proteini, spesifik olarak glial hücrelerde eksprese olur ve dördüncüsü ise periferal sinir sistemindeki nöronlarda üretilir.

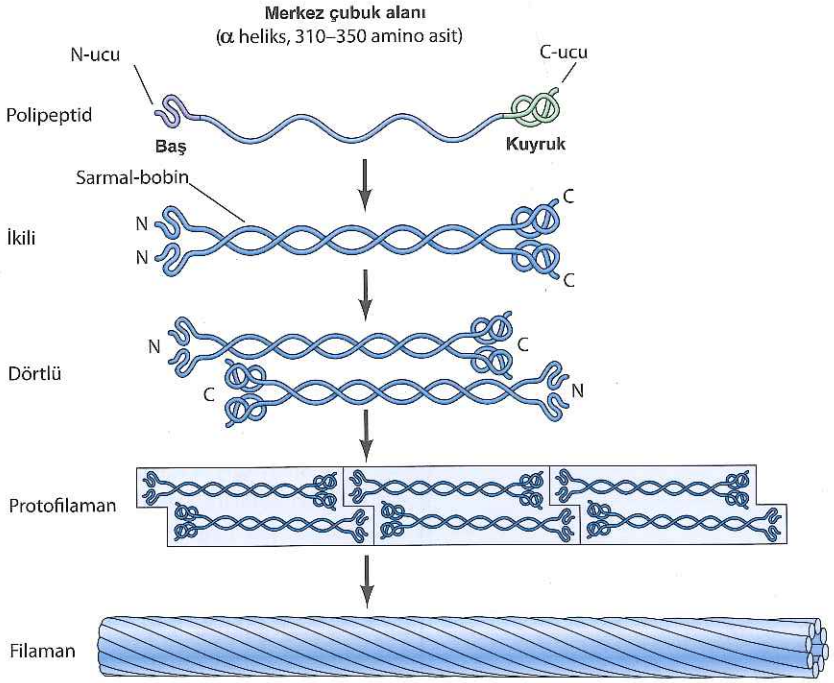
Tip IV ara filaman proteinleri, üç **nörofilaman (NF) proteinini** (sırasıyla hafif, orta ve ağır olarak tanımlanan NF-L, NF-M ve NF-H) içerir. Bu proteinler, α-interneksin ile birlikte, birçok tipteki olgun sinir hücrelerinde ana ara filamanları oluşturur. Özellikle, motor nöronların aksonlarında yoğun olarak bulunur ve boyu bir metreden daha fazla uzayabilen bu ince, uzun yapılara destek sağlayarak önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir. Bir diğer tip IV proteini olan nestin, erken embriyonik gelişimde farklı kök hücrelerinde eksprese edilir. Nestinin diğer ara filamanlardan farkı, yalnızca hücrede diğer ara filamanlar olduğu zaman polimerleşebilmesidir.

Tip V ara filaman proteinleri nükleer laminlerdir. Nükleer laminler, hücre iskeletinin bir parçası olmalarından çok, nükleus zarının altında ortogonal bir tabaka oluşturacak şekilde yapılanan bir nükleus bileşenidir (bkz. Şekil 10.5).

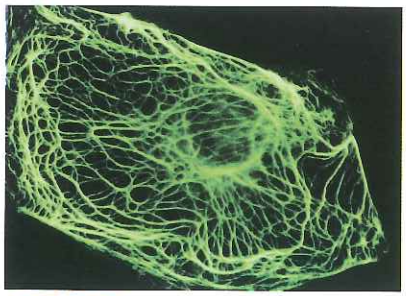
Ara filamanların yapılanması

Boyut ve amino asit dizilerindeki önemli farklılıklara rağmen, farklı ara filaman proteinlerinin yapısal organizasyonu aynıdır (**Şekil 13.53**). Ara filaman proteinlerinin hepsinde, yaklaşık 310 amino asit uzunluğunda merkezi bir α-sarmal çubuk bölgesi vardır (nükleer laminlerde 350 amino asit). Bu merkezi çubuk bölgesinin iki ucu amino ve karboksi uç bölgeleri ile çevrelenmiştir. Bu bölümlerde farklı ara filaman proteinlerinde boyut, dizi ve ikincil yapı değişkenlikleri vardır. Daha sonra da bahsedileceği gibi, α-sarmal çubuk bölgesi filaman yapılanmasında temel rol oynar, değişik baş ve kuyruk bölümlerinin farklı ara filamanların özgün işlevlerinin belirlenmesinde önemli olduğu tahmin edilmektedir.

Filaman yapılanmasında birinci basamak ikili yapının oluşmasıdır. Bunun için miyozin II ağır zincirlerindekine benzer bir şekilde, iki polipeptid zincirinin merkezi çubuk



Şekil 13.53 Ara filamanların yapısı ve yapılanması Ara filaman proteinleri merkezi α-sarmal çubuk bölgeleri ve N-ucu baş ve C-ucu kuyruk bölgeleri içermektedir. İki polipeptidin merkezi çubuk bölgeleri ikili yapı oluşturmak üzere birbiri etrafında kıvrılarak döner. İkililer daha sonra dörtlü yapı oluşturmak üzere zıt-paralel olarak birleşir. Dörtlüler ise önfilamanları oluşturmak üzere uç uca ve filamanlar oluşturmak üzere yan yana bağlanır. Her bir filaman, ip benzeri bir yapı şeklinde birbirine dolanmış olan yaklaşık sekiz önfilaman içermektedir.



Şekil 13.54 Keratin filamanlarının hücre içi düzeni Keratine (yeşil) spesifik floresan antikorlar ile boyalı epitel hücresinin mikrografı. Keratin filamanları nükleusu saran bir halka yapısından plazma zarına doğru uzamaktadır.

bölgeleri dönen sarmal yapısında birbirlerinin etrafına sarılır. Daha sonra ikili hücre iskeleti ara filamanları çakışmayacak şekilde kaymış ve paralel olmayan şekilde bağlanarak dörtlüleri oluşturur, bunların uç uca bağlanması ile önfilamanlar meydana gelir. Ortak bir aşama, birbiri üzerinde dönerek ip benzeri bir yapı oluşturmuş yaklaşık sekiz önfilamanın birbirleriyle etkileşmesidir. Bunlar paralel olmayan tetramerler halinde yapılandıkları için, ara filamanların her iki ucu da aynıdır. Sonuç olarak, aktin filamanlarının ve mikrotübüllerin aksine ara filamanlar apolardır, aktin filamanlarında ya da mikrotübüllerde olduğu gibi farklı artı ve eksi uçları yoktur.

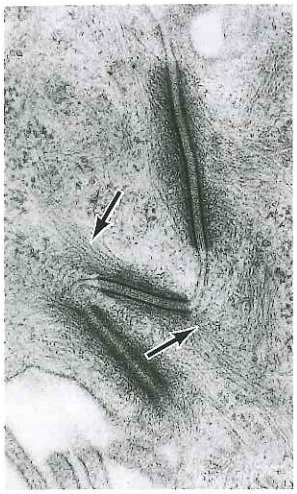
Filaman yapılanması için ara filaman proteinlerinin özgün tipleri arasındaki etkileşimler gereklidir. Örneğin, keratin filamanları daima bir tip I ve bir tip II polipeptidden oluşan heterodimerler şeklinde yapılanır. Bunun tersine, tip III proteinleri yalnızca tek bir polipeptit (örn., vimentin) veya iki farklı tip III protein (örn., vimentin ve desmin) içeren filamanlar halinde yapılanabilir. Bununla birlikte, tip III proteinleri keratinler ile birlikte polimer oluşturmaz. Ara filamanlar genellikle aktin filamanlarından veya mikrotübüllerden daha kararlıdır ve hücre iskeletinin bu gibi diğer elemanları ile ilişkili nükleotid bağlanması tarafından kontrol edilen dinamik davranışlar sergilemez. Bununla birlikte, ara filaman proteinleri sıklıkla fosforillenerek modifiye edilebilir, bu da onların birleşmelerini ya da ayrışmalarını düzenleyebilir. Bir örnek olarak, mitoz sırasında nükleer laminanın ayrışması ve nükleer zarfın yıkılması ile sonuçlanan nükleer laminlerin fosforillenmesi verilebilir (bkz. Bölüm 17). Sitoplazmadaki vimentin gibi ara filamanlar da fosforillenir. Bu fosforilasyon bölünen veya göç eden hücrelerde ara filamanların ayrışmasına ve yeniden düzenlenmesine öncülük edebilir.

Ara filamanların hücre içi organizasyonu

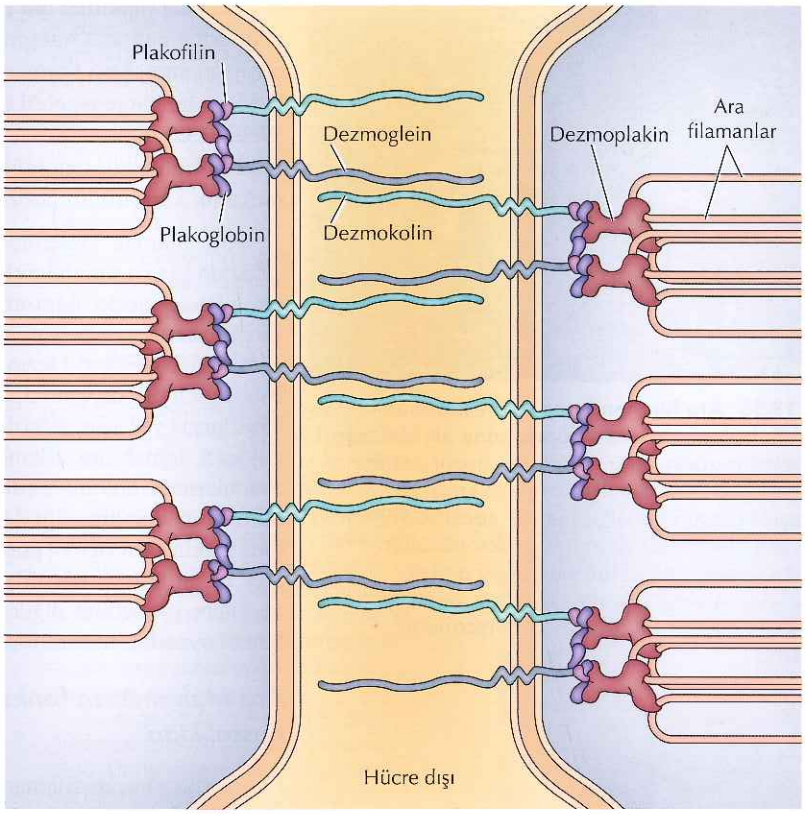
Ara filamanlar, çoğu hücrenin sitoplazmasında, çekirdeği çevreleyen bir halkadan plazma zarına kadar yayılan özenli bir ağ yapısı oluşturur (Şekil 13.54). Hem keratin hem de vimentin filamanları nükleer zarfa tutunur, nükleusu hücre içinde tutar ve bir yerleşim sağlar. Ek olarak, ara filamanlar yalnızca plazma zarı ile değil, hücre iskeletinin aktin filamanları ve mikrotübüller gibi diğer elemanları ile de bağlanır. Bu yüzden ara filamanlar hücre iskeleti elemanlarını bir arada tutan ve hücrenin iç yapısını düzenleyen bir iskele oluşturur.

Epitelyal hücrelerdeki keratin filamanları, plazma zarlarına **dezmozom** ve **hemidezmozom** denilen iki özelleşmiş hücre dokunma bölgesinden sıkıca tutunmuştur. (Şekil 13.55). Dezmozomlar komşu hücreler arasındaki bağlantılardır ve bu hücre-hücre bağlantıları kadherinler ile ilişkili transmembran proteinler aracılığıyla düzenlenir. Dezmozomlar, sitoplazmadaki bölümleri ile, keratin filamanlarının da tutunduğu tipik bir yoğun hücre içi protein plağı ile bağlantılıdır. Bu bağlanma, ara filamanlara bağlanarak onları diğer hücresel yapılar ile ilişkilendiren ve **plakin** adındaki protein ailesinin bir üyesi olan desmoplakin aracılığı ile gerçekleşir. Hemidezmozomlar epitel hücreler ve altındaki bağ dokusu arasındaki morfolojik olarak benzer bağlantılardır. Bu bağlantılarda keratin filamanları plakin ailesinin farklı üyeleri (örn., plektin) aracılığıyla integrinlere bağlanmıştır. Bu nedenle, dezmozomlar ve hemidezmozomlar ara filamanları sırasıyla hücre-hücre ve hücre-yüzey bağlantı bölgelerinde tutar, bu, aktin hücre iskeletinin adherens bağlantı ve fokal adhezyonlarda plazma zarına tutunmasına benzerdir. Dezmozomların her iki ucuna tutunan keratin filamanlarının, epitel hücre tabakasındaki komşu hücreler arasında bir mekanik bağlantı oluşturması, böylece tüm dokunun mekanik kararlılığının sağlaması önemlidir.

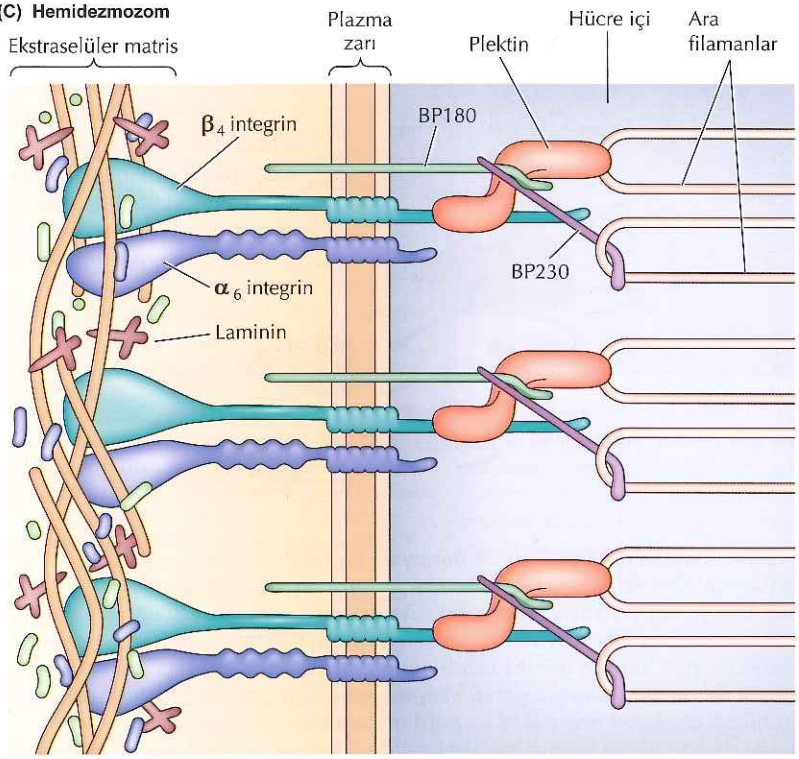
(A)



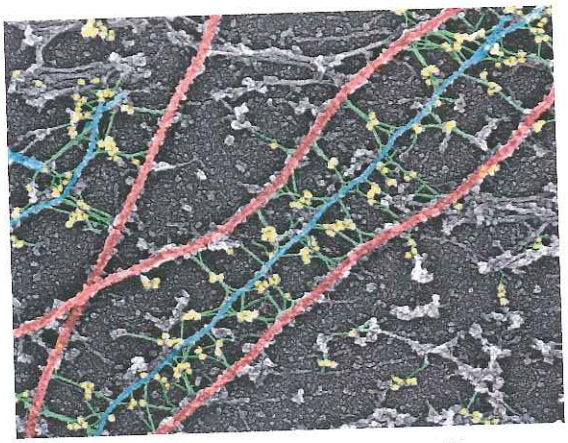
(B) Dezmozom



(C) Hemidezmozom



Şekil 13.55 Ara filamanların dezmozom ve hemidezmozomlara tutunması (A) Keratin filamanlarını (oklar) dezmozomun her iki tarafındaki, protein içeren yoğun hücre içi plaklara tutulu halde gösteren elektron mikrografı. (B) Dezmozomun şematize hali. Dezmosom kadherinleri (dezmoglein ve dezmokolin) bitişik hücreleri, plakoglobin, plakofilin ve dezmoplakin aracılığıyla ara filamanlara bağlar. (C) Hemidezmozomun şematize hali. İntegrin $\alpha_6\beta_4$ ekstraselüler matrisi plektin aracılığıyla ara filamanlara bağlar. BP180 ve BP230 hemidezmozomun bir araya gelmesini ve kararlılığını düzenler.



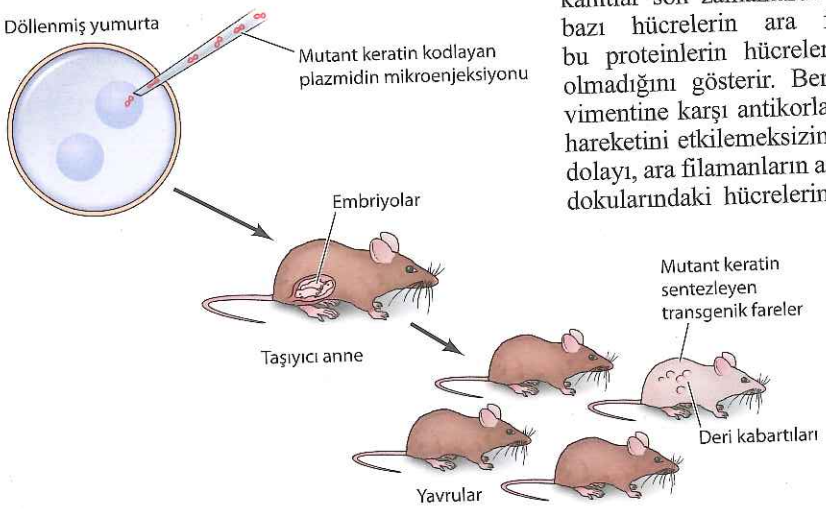
Şekil 13.56 Ara filamanlar ve mikrotübüller arasında bulunan plektin köprülerine ait elektron mikroskobu görüntüsü Plektine özgül antikor ile boyalı fibroblasta ait elektron mikrografı. Mikrograf plektin (yeşil), plektine spesifik antikorlar (sarı), ara filamanlar (mavi) ve mikrotübülleri (kırmızı) göstermek amacıyla yapay olarak renklendirilmiştir. (Tatyana Svitkana ve Gary Borisy'nin izniyle, University of Wisconsin, Madison)

Ara filamanları hücre bağlantı bölgelerine bağlamalarına ek olarak, bazı plakinler ara filamanları hücre iskeletinin diğer elemanlarına bağlar. Örneğin plektin, ara filamanlara bağlanmasının yanı sıra aktin filamanlarına ve mikrotübüllere de bağlanır, böylece bu hücre iskeleti elemanları arasında köprüler oluşturur (Şekil 13.56). Ara filamanlarla bağlantının aktin filamanları ve mikrotübüllere destek sağladığı ve sabitlediği, böylece hücrenin mekanik kararlılığını artırdığı düşünülmektedir.

Ara filaman tiplerinden ikisi, dezmin ve nörofilamanlar, sırasıyla kas ve sinir hücrelerinde özelleşmiş roller oynar. Desmin kas hücrelerindeki aktin-miyozin gruplarını hem birbirlerine hem de plazma zarına bağlar, böylece tek tek kasılabilir elemanların etkilerini birleştirir. Dezmin genindeki bazı mutasyonlar, erken başlangıçlı kardiyomiyopati de dahil olmak üzere çoklu kas hasarlarına yol açar. Nörofilamanlar, çoğu olgun sinir hücresinde bulunan temel ara filamanlardır. Özellikle motor nöronların aksonlarında bol miktarda bulunur, bu bölge, plakin ailesinin nöronal üyeleri aracılığı ile aktin filamanlarına ve mikrotübüllere tutundukları yer olarak görülmektedir. Sinir hücrelerinin bu uzun, ince uzantılarında nörofilamanların, mekanik destek sağlayarak ve hücre iskeletinin diğer elemanlarını sağlamlaştırarak önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Ara filamanların fonksiyonları: Keratinler ve deri hastalıkları

Uzunca bir süre, ara filamanların hücrelere yapısal destek sağladığı düşünülmüş ise de, gerçek fonksiyonlarını gösteren direkt kanıtlar son zamanlarda elde edilmiştir. Kültür koşullarındaki bazı hücrelerin ara filaman proteinleri sentezlememesi, bu proteinlerin hücrelerin *in vitro* çoğalmaları için gerekli olmadığını gösterir. Benzer bir şekilde, kültürdeki hücrelere vimentine karşı antikorların enjeksiyonu, hücre bölünmesini ve hareketini etkilemeksizin, ara filaman ağını tahrip eder. Bundan dolayı, ara filamanların asıl görevinin çok hücreli organizmaların dokularındaki hücrelerin hücre iskeletlerini güçlendirmek için gerekli olduğu düşünülmektedir, hücrelere uygulanan mekanik stresler kültür kabındaki izole çevresel koşullardaki hücreleri etkilememektedir.



Şekil 13.57 Keratin fonksiyonunun deneysel gösterimi Keratin filamanlarının normal birleşmesini bozan mutant bir keratini kodlayan plazmid, döllenmiş yumurtanın pronükleusuna mikroenjekte edilir. Mikroenjekte edilmiş embriyolar daha sonra anneye aktarılır ve bazı yavruların mutant keratin genini kendi genomlarına dahil ettiği gözlenir. Bu transgenik farelerdeki mutant genin ekspresyonu epidermis hücrelerindeki keratin hücre iskeletini bozmakta ve hafif mekanik stres (kaşıntı gibi) varlığında deride hücre erimesine bağlı şiddetli kabarmalara yol açmaktadır.

Ara filamanların *in vivo* rolünü gösteren deneysel kanıtlar ilk olarak 1991'de Elaine Fuchs'un laboratuvarındaki çalışmalar ile elde edildi. Bu araştırmacılar, normal keratin filaman oluşumunu bozan kısa bir polipeptid kodlayan bir keratin delesyon mutantının ekspresyonunun *in vivo* etkilerini araştırmak için, transgenik fare modelleri kullandılar (Şekil 13.57). Bu mutant keratin geni, önce transgenik farelere aktarıldı, epidermisin bazal hücrelerinde

Anahtar Deney

Anormal Deri Gelişimine Neden Olan Mutant Keratinlerin Ekspresyonu

Mutant Keratin Expression in Transgenic Mice Causes Marked Abnormalities Resembling a Human Genetic Skin Disease

Robert Vassar, Pierre A. Coulombe, Linda Degenstein, Kathryn Albers, and Elaine Fuchs
University of Chicago

Cell, 1991, Volume 64, pages 365-380

Bağlam

1991 yılında, epitelyal hücrelerde ara filamanlar iyi bilinmekteydi ve deride tip 1 ve 2 keratinin farklı formlarının, gelişimsel süreçteki görünümleri çalışılmaktaydı. Ara filamanlar hakkında bilinmeyen ise fonksiyonlarıydı. Bütün omurgalı hücrelerinde ara filamanlar bulunurken, onları içermeyen hücre dizileri kültürde yaşamlarını devam ettirebilmekte ve çoğalabilmektedir. Bundan dolayı, ara filamanların fonksiyonları her ne ise, kültürdeki hücreler için değil, olasılıkla çok hücreli organizmaların dokularındaki hücreler için önemliydi.

Fuchs ve arkadaşları, erken gelişim sırasında deri epitelininkeratin 5 (tip I) ve keratin 14 (tip II) eksprese ettiğini biliyorlardı. Keratinler heterodimer olarak polimerize olduklarından anormal bir proteinin ekspresyonunun normal ara filamanların oluşumunu olumsuz etkileyebileceği düşünüldü. Fuchs ve arkadaşları bu olasılığı önce kültürdeki deri hücrelerinde test ettiler ve kesilmiş kısa keratin 14 ekspresyonunun keratin filaman oluşumunu bozduğunu gösterdiler. Bu da, mutant keratinin aynı şekilde transgenik farelerde ekspresyonunun, embriyonun deri hücrelerinde ara filaman ağında hatalara neden olabileceğini düşündürdü. Bu yapılabilirse, normal dokulardaki ara filamanların rolünün incelenmesi gerçekleştirilebilirdi.

Burada tanımlanan deneyde, Fuchs ve arkadaşları transgenik farelerde mutant keratin ekspresyonunun sadece deri hücrelerindeki ara filaman ağını bozmadığını, bunun yanı sıra deride ciddi organizasyon ve doku stabilitesi bozukluklarına yol açtığını gösterdiler. Bu şekilde, bu deneylerle ara filamanların fizyolojik rolünün ilk kez gösterilmesi sağlandı.

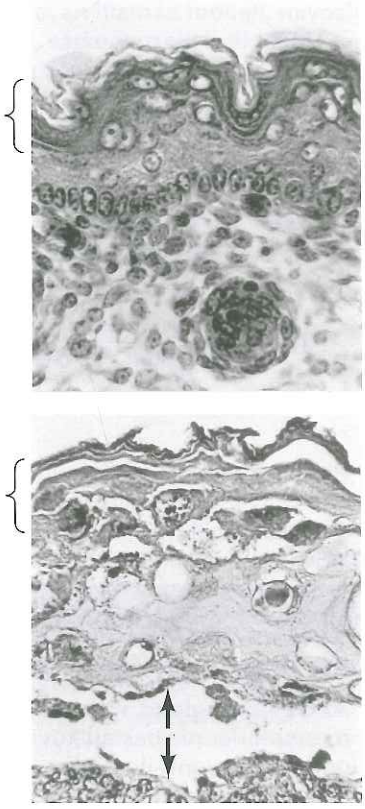
Deneyler

Kültür hücrelerinde gerçekleştirilen ilk deneylerde, Fuchs ve arkadaşları, normal keratinpromotörü üzerinden α-sarmal bölgenin %30'unun ve karboksi ucundaki kuyruğun tamamının eksik olduğu kesilmiş kısa bir proteinin eksprese olduğu mutant keratin 14 genini oluşturdular. Erken fare gelişiminde keratin 14'ün rolünü araştırmak amacıyla, bu mutant keratin 14'ü taşıyan plazmidi, döllenmiş fare yumurtalarına verdiler ve dişi farelere aktararak yavru oluşumunu gerçekleştirdiler. Bütün yavrular keratin 14 açısından incelendi ve bazılarının transgenik olup mutant keratin 14 proteinini eksprese ettiğini gördüler.

Transgenik farelerin çoğu doğumdan sonraki 24 saat içerisinde öldü. Daha uzun süre yaşayanlar, deri sürtünmesi gibi hafif şiddetli mekanik travma sonrasında gelişen, epidermal hücre erimesine bağlı kabarcıklar dahil olmak üzere ciddi deri bozuklukları gösterdi. Transgenik farelerden elde edilen deriye ait boyalı doku kesitlerinin analizinde, en çok etkilenen hayvanların epidermisinde şiddetli (bkz. şekil), diğer hayvanlarda ise bölgesel olarak organizasyon bozuklukları gözlendi. Bölgesel ekspresyon, mozaik hayvanın bir özelliği olup bazı dokular normal embriyo hücrelerinden, bazıları ise transgeni taşıyan hücrelerden köken almaktadır. Mutant proteinin analizi sırasında organizasyon bozukluğu görülen dokular ile mutant keratin 14 ekspresyonunun ilişkili olduğunu gördüler. Bunun yanı sıra, organizasyon bozukluğu gözlenen epidermis miktarı ile doğumdaki travma sırasında doku hasarı ve ölüme yatkınlık arasında net bir korelasyon bulunmaktaydı.

Fuchs ve arkadaşları, daha sonra transgenik farelerde gözlenen doku organizasyon bozukluğu paterninin epidermolizis bulloza simpleks adı verilen insan deri hastalığına benzer olduğunu gözlediler. Bu nedenle,

Elaine Fuchs



Normal ve transgenik fareden elde edilen deri örneği Normal fareden elde edilen örnekte (üstte) altında bulunan doku ile arasında boşluk içermeyen oldukça iyi organize olmuş dış tabaka görülmektedir (köşeli parantez). Transgenik fareden elde edilen deri örneğinde ise (altta) mekanik travmaya bağlı olarak boşluklar içeren dış tabakada ciddi bozulma ve altındaki dokudan ayrılma gözlenmektedir (oklar).

(sonraki sayfada devam edilmiştir)

Anahtar Deney

transgenik fare kesitleri ile hastadan elde edilen kesitleri karşılaştırdıklarında, doku hasarında çok büyük benzerlikler buldular. Buna dayanarak, keratin ya da ara filaman ilişkili proteinlerdeki hasarın insanlarda deride genetik bir hastalığa neden olabileceğini bildirdiler.

Etki

Transgenik farelerde saptanan doku bozuklukları, keratinlerin dokulardaki epitelyal hücrelerin mekanik dayanıklılığını sağladığına yönelik olası rollerine doğrudan destek sağlayan ilk kanıttır. Artık, ara filaman hücre iskeletinin, mekanik stresle karşı karşıya kalan ince barsak, kalp ve iskelet kası gibi dokuların yapısı için önemli olduğu bilinmektedir. Bunun aksine, maya gibi tek hücreli ökaryotlar ve birçok küçük omurgasız canlı, ara filamanları olmaksızın, yapısal destek için aktin veya tübülin hücre iskeletini genellikle modifiye ederek yaşamlarını mükemmel bir şekilde devam ettirebilmektedir. Fuchs ve arkadaşlarının sonuçları aynı zamanda bazı insan hastalıkları için bir temel oluşturmuştur. Günümüzde, insan hastalıklarında kusurlu olduğu bilinen, başlangıçta transgenik farelerde çalışılan keratin 5 ve keratin 14 de dahil, 17'den fazla farklı keratin bulunduğu bilinmektedir.

eksprese edildi ve normal keratin hücre iskeletinin oluşumu bozuldu. Bu derinin sürtünmesi gibi orta şiddetteki mekanik travmaları takiben oluşan epidermal hücre kaybı, kabarcıkları içeren çok şiddetli deri anomalilerinin gelişmesi ile sonuçlandı. Böylece, bu transgenik hayvanlardaki deri anomalileri, keratinlerin rolünün, dokulardaki epitel hücrelerinin mekanik gücünü sağlamak olduğu öngörüsüne direkt destek sağladı. Daha sonra, farelerde aynı keratin geninin homolog rekombinasyon ile inaktive edilmesinin de aynı şekilde sonuçlandığı gösterildi.

Bu deneyler epidermolizis bulloza simpleks (EBS) denilen bir insan genetik hastalığının moleküler temelini de gösterdi. Mutant keratin genini eksprese eden transgenik fareler gibi, bu hastalarda da küçük travmalar sonrasında oluşan hücre erimesinin sonucunda deride kabarcıklar gelişmektedir. Bu benzerlik, EBS'li hastalarda keratin geninin çalışmalarını başlattı, bu da EBS'ye neden olan ve keratin genlerinin normal yapılanmasını engelleyen keratin gen mutasyonlarının gösterilmesine öncülük etti. Böylece, hem transgenik hayvanlardaki deneysel çalışmalar, hem de bir insan genetik hastalığının moleküler analizi çalışmaları, keratinin mekanik stres altındaki deri hücrelerindeki rolünü gösterdi. Süregelen çalışmalar, epidermal hücrelerde dayanıklılık bozuklukları ile karakterize diğer birçok kalıtsal deri hastalığından diğer keratin tiplerindeki mutasyonların sorumlu olduğunu göstermektedir.

ÖZET

Aktin Filamanların Yapısı Organizasyonu

- ***Aktin filamanların yapılanması ve ayrışması:*** Aktin filamanları aktin monomerlerinin baştan-kuyruğa heliks yapısı meydana getirmek üzere polimerizasyonu ile oluşur. Hücrede aktin bağlayan çeşitli proteinler aktin filamanlarının yapılanması ve ayrışmasını düzenlemektedir. Bkz. **Animasyon 13.1.**

- ***Aktin filamanların düzenlenmesi:*** Aktin filamanları, demetler ya da üç boyutlu ağ oluşturmak üzere aktin bağlayan proteinler ile çapraz bağlıdır.

- ***Aktin filamanların plazma zarı ile etkileşimleri:*** Plazma zarının altında aktin filaman ağı ve diğer hücre iskeleti proteinleri yer almaktadır ve bunlar hücrenin şeklini belirler. Plazma zarına, aktin demetleri de bağlanır ve hücre-hücre ve hücre-yüzey noktalarında hücreyi tutar.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

aktin, mikrofilaman, aktin-bağlayan protein, globüler (G) aktin, filamente (F) aktin, yürüme, sitokalasin, falloidin, formin, ARP2/3 kompleksi, profiling, tropomiyozin, kofilin

aktin demeti, aktin ağı, aktin-demetleyici protein, paralel demet, fimbrin, kasılabilir halka, α-aktinin, filamin

hücre korteksi, spektrin, ankrin, distrofin, integrin, fokal adhezyon, stres lifi, talin, vinkulin, adherens bağlantı, adhezyon kemeri, kadherin, katenin

ÖZET

- ***Mikrovilluslar:*** Aktin filamanları mikroviluslar ve stereosil gibi hücre yüzeyinin kalıcı çıkıntı benzeri yapılarını destekler.
- ***Hücre yüzey çıkıntıları ve hücre hareketi:*** Plazma zarının geçici uzantıları fagositoz ve hücre hareketinde sorumludur. Hücre uzantıları, hücrenin ön ucunda çok sayıda aktin filamanının büyümesiyle sağlanır. Hücre hareketi yeni hücre uzantılarının sonunda adhezyonların oluştuğu karmaşık bir süreç olup hücre gövdesi miyozin II etkisiyle stres lifleri boyunca ileri götürülür ve gerideki uç hücre gövdesine çekilir. Bkz. **Videolar 13.1-13.3.**

Miyozin Motorları

- ***Kas kasılması:*** Kas üzerine gerçekleştirilen çalışmalar, miyozinin kuvvet ve hareket sağlamak üzere ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanan bir motor protein olduğunu gösterdi. Kas kasılması aktin ve miyozin filamanlarının bir birlerinin üzerinde kayması sonucu gerçekleşir. ATP hidrolizi, miyozin ve aktin arasında tekrarlayan döngüler halinde etkileşimlere yol açar. Bu etkileşimler sırasında, miyozin baş gruplarının aktin filamanları boyunca hareketinden dolayı konformasyonel değişiklikler gözlenir. Bkz. **Animasyon 13.2.**
- ***Aktin ve miyozinin kas dışı hücrelerde kasılabilir yapılanmaları:*** Aktin ve miyozin II'nin birleşmeleri, kas hücresi olmayan hücrelerde sitokinezi de içeren çeşitli hareketlerden sorumludur.
- ***Konvensiyonel olmayan miyozinler:*** Kasılmada görevli olmayan diğer miyozin çeşitleri membran veziküllerinin ve organellerin aktin filamanları boyunca taşınmasına hizmet eder.

Mikrotübüller

- ***Mikrotübüllerin yapısı ve dinamik organizasyonu:*** Mikrotübüller tübülinin geri-dönüşümlü polimerizasyonu ile oluşur. Dinamik kararsızlık gösterir ve tübülin polimerizasyonu sonrasında, GTP'nin hidrolizi ile, süre gelen birleşme ve ayrışma döngüleri geçirir. Bkz. **Animasyon 13.3.**
- ***Mikrotübüllerin yapılanması:*** Mikrotübüller çoğu hayvan hücresinde, hücre merkezine yakın bir konumda bulunan mikrotübül-organize edici merkezden, yani sentrozomdan, dışarıya doğru uzanır. Sentrozom genellikle sentriyol çevre maddesi ile çevrelenmiş bir çift sentriyol içerir. Mikrotübüllerin büyümesi, daha sonra eksi uçlarına tutunmasına hizmet edecek olan, sentriyol çevre maddesi tarafından başlatılır.
- ***Hücrelerde mikrottübüllerin organizasyonu :*** Mikrotübüllerin, tübülinin translasyon-sonrası değişiklikler ve mikrotübüle bağlanan proteinlerin bağlanması yoluyla seçici olarak stabilizasyonu, sinir hücresi aksonlarının ve dendritlerinin uzamasında olduğu gibi hücre şeklini ve polaritesini belirler.

Mikrotübül Motorları ve Hareket

- ***Mikrotübül motor proteinleri:*** İki çeşit motor protein ailesi olan kinezinler ve dineinler mikrotübüller boyunca gerçekleşen hücre hareketinden sorumludur. Kinezinlerin çoğu mikrotübülün artı ucuna, dineinler ve kinezin ailesinin bazı üyeleri ise eksi uca doğru hareket eder. Bkz. **Animasyon 13.4.**

ANAHTAR SÖZCÜKLER

mikrovillus, fırçakenar, stereosil, villin

yalancı ayak, lamellipodia, filopodia, Rho, WASP

miyozin, moleküler motor, kas lifi, miyofibril, sarkomer, kayan filaman modeli, miyozin II, sarkoplazmik retikulum, troponin

sitokinez, kasılabilir halka, miyozin hafif zincir kinaz, kalmodulin

Konvensiyonel olmayan miyozin, miyozin I

mikrotübül, tübülin, dinamik kararsızlık, kolçisin, kolsemid, vinkristin, vinblastin, taksol, mikrotübül-ilişkili protein (MAP)

sentrozom, mikrotübül düzenleyici merkez, γ–tübülin halka kompleksi, sentriyol, sentriyol çevre maddesi

kinezin, dinein, aksonemal dinein, video ile desteklenmiş mikroskopi, sitoplazmik dinein

ÖZET

- ***Kargo taşınması ve hücre içi düzenlenme:*** Mikrotübüller boyunca hareket, sitoplazma içinde makromolekülleri, zar veziküllerini ve organelleri taşımanın yanı sıra hücre içerisinde sitoplazmik organellerin konumlanmasını sağlar. Bkz. **Videolar 13.4-13.5.**
- ***Sil ve kamçılar:*** Siller ve kamçılar plazma zarının mikrotübül kökenli çıkıntılarıdır. Hareketleri mikrotübüllerin dinein motorlarının davranışları ile desteklenen kaymanın bir sonucudur. Bkz. **Videolar 13.6-13.8.**
- ***Mikrotübüllerin mitoz sırasında yeniden düzenlenmesi:*** Mitozun başında, mikrotübüller yeniden organize olarak kromozomların ayrılmasından sorumlu olan mitotik iği oluşturur.
- ***Kromozom hareketi:*** Kopyalanmış kromozomlar metafaz plağında dizilir. Mitozun anafaz aşamasında, kardeş kromozomlar ayrılır ve mitotik iğin karşıt kutuplarına hareket eder.

Ara Filamanlar

- ***Ara filaman proteinleri:*** Ara filamanlar çeşitli hücrelerde eksprese olan 70'den fazla proteinin polimerleridir. Hücre hareketinde yer almaz ancak hücresel işlevlerin konumlanması için bir iskele görevi görür ve hücrelere ve dokulara mekanik destek sağlar.
- ***Ara filamanın yapılanması:*** Ara filamanlar, iki polipeptid zincirinin birbiri etrafında dönen sarmal şeklinde dolanması ile oluşan dimerlerden meydana gelir. İkililer daha sonra dörtlüleri ve bunlar da ön filamanları oluşturur. Ara filamanlar ise ip benzeri bir yapı halinde birbiri etrafında dolanan ön filamanlardan oluşur.
- ***Ara filamanların hücre içi organizasyonu:*** Ara filamanlar birçok hücre tipinde nükleus çevresindeki halka yapısından plazma zarına doğru çıkan ağ yapısı oluşturur. Epitelyal hücrelerde, ara filamanlar hücre zarına dezmozom ve hemidezmozom adı verilen özelleşmiş hücre bağlantı noktalarından tutunur. Bu filamanlar aynı zamanda kas ve sinir hücrelerinde özelleşmiş rollere sahiptir.
- ***Ara filamanların fonksiyonları:*** **keratinler ve deri hastalıkları:** Deri ve sinir sistemi hastalıkları: Ara filamanların, dokulardaki hücrelere mekanik güç sağlamadaki görevi, tarnsgenik farelere mutant keratin geninin aktarılmasıyla gösterilmiştir. Benzer keratin geni mutasyonları insan deri hastalıklarından sorumludur.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

sil, kamçı, aksonem, neksin, bazal cisim

mitotik iğ, kinetokor mikrotübülü, kromozomal mikrotübül, interpolar mikrotübül, yıldızsı mikrotübül

anafaz A, anafaz B

ara filaman, keratin, vimentin, desmin, nörofilaman (NF) proteini

dezmozom, hemidezmozom, plakin

Atıf

Hücre

Eşlik Eden Web Sitesi

sites.sinauer.com/cooper7e

sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Sorular

1. Aktin filamanları neden farklı bir polariteye sahiptir? Aktin filamanlarının polaritesi kas kasılmasında neden önemlidir?
2. Sitokalazin ve falloidin aktin filamanlarının yürümesini nasıl etkiler?
3. ADF/kofilin, profilin ve Arp2/3 kompleksi aktin filamanlarının yapılanmasını ve dönüşümünü nasıl düzenler?
4. Kas sarkomerlerinin hangi bandı ya da bölgesinin kasılma sırasında uzunluğu değişir? A bandının uzunluğu neden değişmez?
5. Ca^{2+} düz kasların kasılmasını nasıl düzenler?
6. Vale ve arkadaşlarının kinesin izolasyonu için strateji geliştirmelerine yardımcı olan anahtar gözlem nedir?

7. Kültürlenmiş memeli hücrelerinde mikrotübüller boyunca insülin içeren salgı veziküllerinin taşınması üzerinde çalışıyorsunuz. Kolsemid ile muamele bu veziküllerin taşınmasını nasıl etkiler?
8. γ-tubulinin hücresel fonksiyonu nedir?
9. Kültür ortamında vimentini hedefleyen siRNA'ların ekspresyonu fibroblastların büyümesini nasıl etkiler?
10. Farklı uçlara sahip monomerlerin birleşmesinden oluşmalarına rağmen ara filamanlar neden apolardır?
11. Neksinin uzaklaştırılması sil hareketlerini nasıl etkiler?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

(Her ana bölüm için en önemli derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Aktin Filamanların Yapısı ve Organizasyonu

Baines, A. J., H.-C. Lu and P. M. Bennett 2013. The protein 4.1 family: hub proteins in animals for organizing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1838: 605-619. [R]

Bravo-Cordero, J. J., M.A. O. Magalhaes, R. J. Eddy, L. Hodgson and J. Condeelis. 2013. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 405-415. [R]

Breitsprecher, D. and B. L. Goode. 2013. Formins at a glance. *J. Cell Sci.* 126: 1-7. [R]

Campellone, K. G. and M. D. Welch. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 237-251. [R]

Dominguez, R. and K. C. Holmes. 2011. Actin structure and function. *Ann. Rev. Biophy s.* 40: 169-186. [R]

Fehon, R. G., A. I. McClatchey and A. Bretscher. 2010. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 276-287. [R]

Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai and K. C. Holmes. 1990. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* 347: 37-44. [P]

Ozyamak, E., J. M. Kollman and A. Komeili. 2013. Bacterial actins and their diversity. *Biochemistry* 52: 6928-6939. [R]

Pollard, T. D. and J. A. Cooper. 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326: 1208-1212. [R]

Rahimov, F. and L. M. Kunkel. 2013. Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* 201: 499-510. [R]

Ridley, A. J. 2011. Life at the leading edge. *Cell* 145: 1012-1022. [R]

Rotty, J.D., C. Wu and J. E. Bear. 2013. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 7-12. [R]

Yonemura, S. 2011. Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23:515-522. [R]

Zhou, A. X., J. H. Hartwig and L. M. Akyurek. 2010. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol.* 20: 113-123. [R]

Miyozin Motorları

Finer, J. T., R. M. Simmons and J. A. Spudich.1994. Single myosin molecule mechanics: Piconewton forces and nanometre steps. *Nature* 368: 113-119. [P]

Geeves, M. A. and K. C. Holmes. 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 687-728. [R]

Greenberg, M. J. and E. M. Ostap. 2013. Regulation and control of myosin-I by the motor and light chain binding domains. *Trends Cell Biol.* 23: 81-89. [R]

Hammer, J. A. III and W. Wagner. 2013. Functions of class V myosins in neurons. *J. Biol. Chem.* 288: 28428-28434 . [R]

Hartman, M. A., D. Finan, S. Sivaramakrishnan and J. A. Spudich. 2011. Principles of unconventional myosin function and targeting. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 27: 133-155. [R]

Huxley, A. F. and R. Niedergerke . 1954. Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173:971-973. [P]

Huxley, H. E. 1969. The mechanism of muscle contraction. *Science* 164: 1356-1366. [R]

Huxley, H. E. and J. Hanson. 1954. Changes in the cross-striations of muscle contraction and their structural interpretation. *Nature* 173: 973-976. [P]

Kull, F. J. and S. A. Endow. 2013. Force generation by kinesin and myosin cytoskeletal motor proteins. *J. Cell Sci.* 126: 9-19. [R]

Rayment, I., H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Kolmes and R. A. Milligan. 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261: 58-65. [P]

Rayment, I., W. R. Rypniewski, K. Schmidt Base, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann , G. Wesenberg and H. M. Holden. 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor. *Science* 261: 50-58. [P]

Sweeney, H. L. and A. Houdusse . 2010. Myosin VI rewrites the rules for myosin motors. *Cell* 141: 573-582. [R]

Mikrotübüller

Akhmanova, A. and M. O. Steinmetz. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Rev. Mol. Cell Biol* . 9: 309-322. [R]

Al-Bassam, J. and F. Chang. 2011. Regulation of microtubule dynamics by TOG-domain proteins XMAP215/Dis1 and CLASP. *Trends Cell Biol.* 21: 604-614. [R]

Bornens, M. 2012. The centrosome in cells and organisms. *Science* 335: 422-426. [R]

Gonczy, P. 2012. Towards a molecular architecture of centriole assembly. *Nature Rev. Mol. Cell Biol* . 13: 425-435. [R]

Howard, J . and A. A. Hyman. 2009. Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 569-574. [R]

Janke, C. and J. C. Bulinski. 2011. Posttranslational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 773-785. [R]

Kueh, H. Y. and T. J. Mitchison. 2009. Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics. *Science* 325: 960-963. [R]

Mennella, V., D. A. Agard, B. Huang and L. Pelletier. 2014. Amorphous no more: subdiffraction view of the pericentriolar material architecture. *Trends Cell Biol.* 24: 188-197. [R]

Mitchison, T. and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237-242. [P]

Nogales, E., M. Whittaker, R. A. Milligan and K. H. Downing. 1999. High-resolution model of the microtubule . *Cell* 96: 79-88. [P]

Osborn, M. and K. Weber. 1976. Cytoplasmic microtubules in tissue culture cells appear to grow from an organizing structure towards the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 867-871. [P]

Wasteneys, G. O. and J. C. Ambrose. 2009. Spatial organization of plant cortical microtubules : close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol.* 19: 62-71. [R]

Mikrotübül Motorları ve Hareketleri

Bettencourt-Dias, M., F. Hildebrandt, D. Pellman, G. Woods and S. A. Godinho. 2011. Centrosomes and cilia in human disease. *Trends Genet.* 27: 307-315. [R]

Brady, S. T. 1985. A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal motor. *Nature* 317: 73-75. [P]

Brady, S. T., R. J. Lasek and R. D. Allen.

1982. Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon. *Science* 218: 1129-1131. [P]

Cross, R. A. and A. McAinsh. 2014. Prime movers: the mechanochemistry of mitotic kinesins. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 257-271. [R]

Gennerich, A. and R. D. Vale. 2009. Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 59-67. [R]

Gibbons, I. R. and A. Rowe. 1965. Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science* 149: 424-426. [P]

Hammond, J. W., D. Cai and K. J. Verhey. 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 71-76. [R]

Hirakawa, N., Y. Noda, Y. Tanaka and S. Niwa. 2009. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 682-696. [R]

Kardon, J. R. and R. D. Vale . 2009. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 854-864. [R]

Lasek, R. J. and S. T. Brady. 1985. Attachment of transported vesicles to microtubules in axoplasm is facilitated by AMP-PNP. *Nature* 316: 645-647. [P]

Lüders, J. and T. Stearns. 2007. Microtubuleorganizing centres: a re-evaluation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 161-167. [R]

Marx, A ., A. Hoenger and E. Mandelkow. 2009. Structures of kinesin motor proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66: 958-966. [R]

Nigg, E. A. and T. Stearns. 2011. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nature Cell Biol.* 13: 1154-1160. [R]

Pedersen, L. B., I. R. Veland, J. M. Schroder and S. T. Christensen. 2008. Assembly of primary cilia. *Dev. Dyn.* 237: 1993-2006. [R]

Roberts, A. J., T. Kon, P. J. Knight, K. Sutoh and S. A. Burgess. 2013. Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nature Rev. M ol. Cell Biol.* 14: 713-726. [R]

Salmon, E. D. 1995. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5: 154-157. [R]

Scholey, J. M., I. Brust-Mascher and A. Mogilner. 2003. Cell division. *Nature* 422: 746-752. [R]

Vale, R. D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112: 467-480. [R]

Vale, R. D., T. S. Reese and M. P. Sheetz. 1985. Identification of a novel forcegenerating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42: 39-50. [P]

Ara Filamanlar

Coulombe, P. A., M. E. Hutton, A. Letai, A. Hebert, A. S. Paller and E. Fuchs. 1991. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: Genetic and functional analyses. *Cell* 66: 1301-1311. [P]

Epstein, E. H., Jr., J. M. Bonifas, and A. L. Rothman. 1991. Epidermolysis bullosa simplex: Evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science* 254: 1202-1205. [P]

Fuchs, E. and D. W. Cleveland. 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279: 514-519. [R]

Godsel, L. M., R. P. Hobbs and K. J. Green. 2008. Intermediate filament assembly: dynamics to disease. *Trends Cell Biol.* 18: 28-37. [R]

Goldfarb, L. G. and M. C. Dalakas. 2009. Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J. Clin. Invest* 119: 1806-1813. [R]

Graumann , P. L. 2007. Cytoskeletal elements in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 61: 589-618. [R]

Herrmann, H., H. Bar, L. Kreplak, S. V. Strelkov and U. Aebi. 2007. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nature Rev. Mol . Cell Biol.* 8: 562-573. [R]

Kim, S. and P. A. Coulombe. 2007. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev.* 21: 1581-1597. [R]

Snider, N. T. and M. B. Omary. 2014. Posttranslational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions . *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 163-177. [R]

Suozzi, K. C., X. Wu and E. Fuchs . 2012. Spectraplakins: Master orchestrators of cytoskeletal dynamics. *J. Cell Biol.* 197: 465-475. [R]

Wiehe, G. and L. Winter. 2011. Plectin isoforms as organizers of intermediate filament cytoarchitecture. *Bioarchitecture.* 1: 14-20. [R]

BÖLÜM 14

Plazma Zarı

Plazma Zarının Yapısı 531

Küçük Moleküllerin Taşınması 544

Endositoz 560

Moleküler Tıp
Kistik Fibrozis 557

Anahtar Deney
LDL Reseptörü 564

Tüm hücreler-prokaryot ve ökaryot-hücrenin sınırlarını belirleyen ve içeriğini dış çevreden ayıran bir plazma zarıyla kuşatılmıştır. Plazma zarı moleküllerin geçişine seçici bir engel oluşturarak sitoplazmanın bileşimini belirler. Bu, sonuç olarak hücrenin kendisine ait kimliğini belirlediği için, plazma zarı hücre evriminde en önemli yapılardan biridir. Gerçekten, Bölüm 1'de tartışıldığı gibi ilk hücrenin, kendi başına replike olabilen RNA'nın bir fosfolipid zarla çevrilmesiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir.

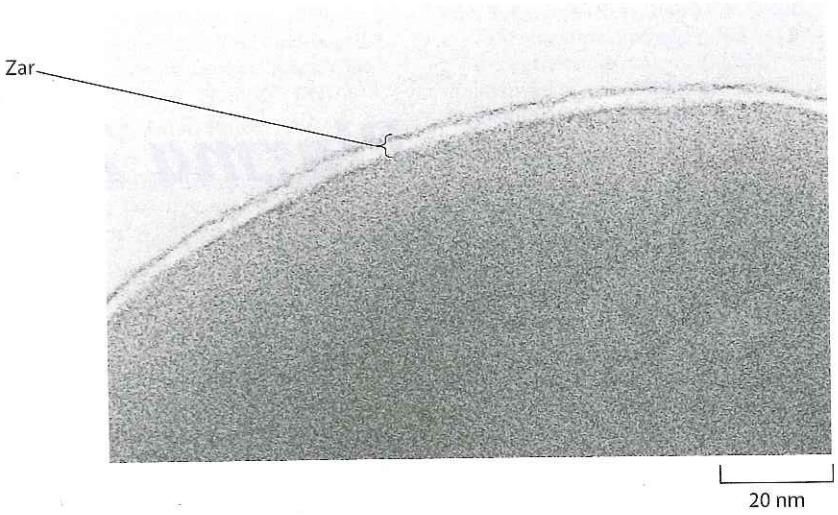
Günümüz hücrelerinin plazma zarları lipid ve proteinlerden oluşmaktadır. Plazma zarının esas yapısı, suda-çözünen molekülleri geçirmeyen bir fosfolipid çift tabakadır. Bu nedenle, iyonların ve bir çok biyolojik molekülün plazma zarından geçişleri, moleküllerin hücre içine ve dışına seçili trafiğinden sorumlu olan proteinler aracılığıyla gerçekleşir. Plazma zarındaki diğer proteinler, çok hücreli organizmaların hücreleri arasındaki etkileşimleri denetler ve çevreden gelen sinyallerin alındığı algılayıcılar olarak görev yaparlar. Böylece plazma zarı ikili rol oynar: Bir yandan sitoplazmayı izole ederken diğer yandan hücre ile çevresi arasında etkileşimi sağlar.

Plazma Zarının Yapısı

Diğer tüm hücresel zarlar gibi plazma zarı da lipidler ile proteinlerden oluşur. Zarın ana yapısı, iki sulu ortam arasında sağlam bir engel oluşturan bir fosfolipid çift tabakasıdır. Plazma zarı göz önüne alındığında bu iki bölme hücrenin içi ile dışıdır. Fosfolipid çift tabakasına gömülü olan proteinler plazma zarının, seçili molekül taşıma ve hücre-hücre tanıma gibi özel işlevlerini yerine getirir.

Lipid çift tabaka

Plazma zarı tüm hücresel zarlar arasında en detaylı çalışılmış olandır ve bu, çoğunlukla, güncel zar yapısı kavramlarımızdaki gelişmeler plazma zarının incelenmesi yoluyla sağlanmıştır. Memeli kırmızı kan hücrelerinin (eritrosit) plazma zarları, zar yapısının incelenmesinde model olarak özellikle yararlı olmuştur. Memeli kırmızı kan hücreleri nükleus ve iç zarlara sahip olmadıklarından, biyokimyasal analiz için saf plazma zarının izole edilebileceği bir kaynak oluştururlar. Gerçekten de, kırmızı kan hücresi plazma zarının incelenmesi, biyolojik zarların lipid çift tabakasından oluştuğunun ilk kanıtını sağlamıştır. Hollanda'lı iki bilim insanı (E. Gorter ve R. Grendel) 1925'de, plazma zarının bilinen yüzey alanına eşdeğer belli sayıda kırmızı kan hücresinden zar lipidlerini elde ettiler. Daha sonra, elde edilen lipidin, bir



Şekil 14.1 Plazma zarının çift zar tabaka yapısı İnsan kırmızı kan hücresinin elektron mikroskop görüntüsü. Plazma zarının tren yolu rayı görüntüsüne dikkat edin. (Courtesy of J. David Robertson, Duke University Medical Center)

hava-su ara yüzeyinde tek katman halinde yayılımının kapladığı yüzey alanını saptadılar. Lipid tek tabakasının yüzey alanının, eritrosit plazma zarının kapladığının iki katı olduğu anlaşılınca, zarların lipid tek tabakasından değil çift tabakasından oluştuğu sonucuna varıldı.

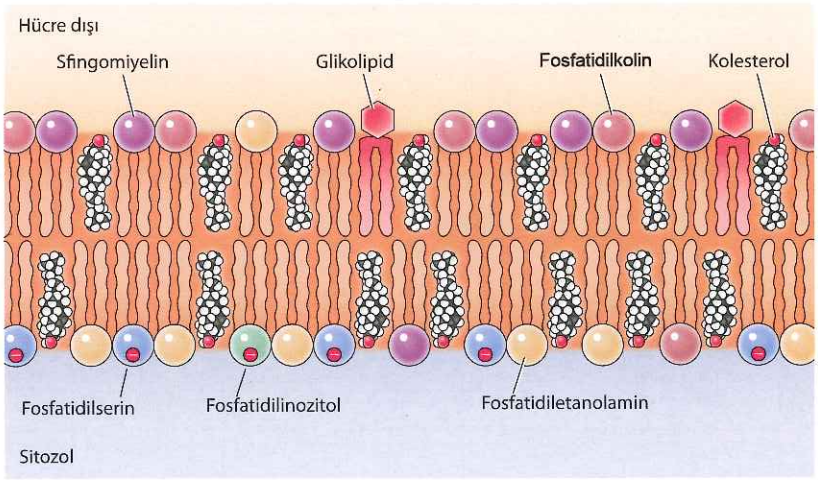
Eritrosit plazma zarının çift tabaka yapısı, yüksek-büyütmeli elektron mikroskop görüntülerinde açık olarak görülür (Şekil 14.1). Plazma zarı, bir ara bölge ile ayrılan iki yoğun hat-genellikle, "tren yolu rayı" olarak adlandırılan bir yapıda görünmektedir. Bu görüntü, transmisyon elektron mikroskopisinde boya olarak kullanılan (bkz. Bölüm 1) elektron-yoğun ağır metallerin, fosfolipidlerin polar gruplarına bağlanması ve bunların karanlık hatlar şeklinde belirmesinin sonucudur. Yoğun çizgiler, zarın, açık boyanan ve hidrofobik yağ asidi zincirlerini içeren iç bölümüyle birbirinden ayrılır.

Bölüm 2'de anlatıldığı gibi, hayvan hücrelerinin zarları dört temel fosfolipid içerir (**fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol** ve **sfingomiyelin**), ki bunların toplamı plazma zarındaki lipidlerin yaklaşık %50'sine denk gelir (Tablo 14.1). Fosfolipidler çift zar tabakasının iki yarısına asimetrik olarak dağılırlar (Şekil 14.2). Plazma zarının dış yaprağı esas olarak fosfatidilkolin ve sfingomiyelinden oluşur, buna karşın fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin iç yaprakta baskın olan fosfolipidlerdir. Bölüm 11'de tartışıldığı gibi, sfingomiyelin Golgi membranının lümen tarafında sentezlenir. Bu da onun plazma zarının hücre dışına bakan kısmına yönelik olan konumunu belirler. Diğer fosfolipidler ise endoplazmik retikulumda sentezlenir ve simetrik bir şekilde membranın sitozolik ve lümenal bölgelerine doğru dağılım gösterirler (bkz. Şekil 11.22). Plazma zarı üzerinde fosfolipidlerin bu şekildeki

Tablo 14.1 Plazma Zarının Lipid İçeriği

Lipid	Mol yüzdesi
Fosfatidilkolin	20
Fosfatidiletanolamin	11
Fosfatidilserin	4
Fosfatidilinozitol	2
Kolesterol	49
Sfingomiyelin	13
Glikolipid	1

Kaynak: Veriler, G.van Meer, D. R. Voelker ve G. W. Feigenson. 2008. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 112. kaynağındaki memeli hücrelerden alınmıştır.



Şekil 14.2 Plazma zarının lipid bileşenleri Dış yaprak baskın olarak fosfatidilkolin, sfingomiyelin ve glikolipidler içerirken iç yaprak fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve fosfatidilinositol içerir. Kolesterol her iki yaprağa da dağılmıştır. Fosfatidilserin ve fosfatidilinositol baş gruplarının net negatif yükü belirtilmiştir. Fosfolipidlerin, glikolipidlerin ve kolesterolün yapıları Şekil 2.7, 2.8 ve 2.9'da görülmektedir.

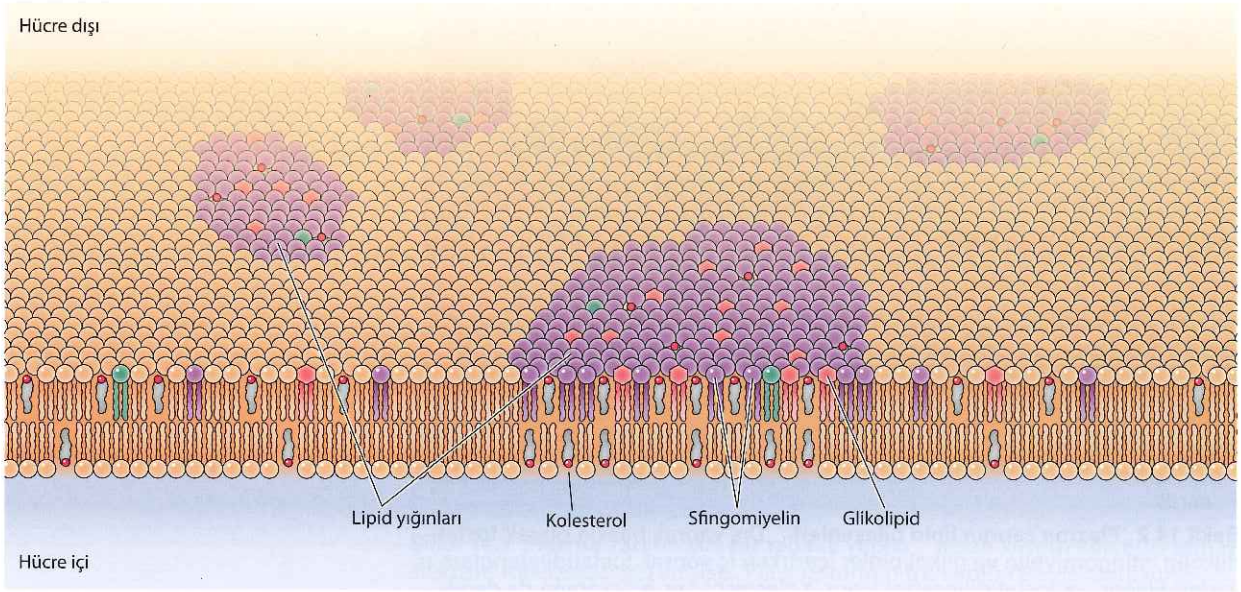
asimetrik düzeni fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserini iç zar yapısına ve fosfatidilkolini dış zar yapısına selektif olarak yerleştiren transportörler aracılığı ile gerçekleşir. Fosfatidilserinin baş kısmı negatif yüklüdür. Bu nedenle iç membranda yüksek oranlarda bulunması plazma zarının sitozolik yüzünde net negatif yük varlığı ile sonuçlanır. Ayrıca fosfatidilserinin iç yapraktaki yerleşimi Bölüm 18'de tartışıldığı üzere programlanmış hücre ölümünde önemli rol oynamaktadır.

Hayvan hücrelerinin plazma zarları fosfolipidlere ek olarak **glikolipidler** ve **kolesterol** de içerirler. Glikolipidler, plazma zarında yalnızca dış yaprakta ve karbohidrat kısımları Golgi'de sentezleri ile tanımlandığı şekilde hücre yüzeyinde açıkta olacak şekilde bulunurlar. Plazma zarı lipidlerinin küçük bir bölümünü oluşturan, göreli olarak az bulunan zar bileşenleridir. Diğer yandan kolesterol, hayvan hücrelerinde fosfolipidlerle yaklaşık olarak aynı molar miktarda bulunan temel bir zar bileşenidir. Kolesterol, polar hidroksil gruplarını fosfolipid baş gruplarına yakın konumda tutarak (bkz. Şekil 14.2) fosfolipid çift tabakanın içine doğru yerleşim gösteren sert bir yapıya sahiptir (bkz. Şekil 2.9). Diğer fosfolipidlere göre sfingomiyeline karşı daha yüksek afinite gösterdiğinden , dış yaprak üzerinde daha yoğundur. Bakteri ve lipid hücrelerinde kolesterol bulunmaz ancak bunun yerine benzer görevleri yerine getiren kolesterol ile ilişkili bileşenlere (sterol veya sterol benzeri lipidler) sahiptirler.

Lipid çift tabakalarının iki genel özelliği zar işlevi yönünden çok önemlidir. İlk olarak, fosfolipidlerin yapısı, zarların iki sulu ortam arasında engel oluşturma temel işlevinden sorumludur. Fosfolipid çift tabakasının iç kısmı hidrofobik yağ asidi zincirleriyle dolu olduğu için, zar, iyonlar ve

Bilgi İçin

Planlanmış hücre ölümü sırasında fosfatidilserin hücrelerin fagositoz ile uzaklaştırılmasına ilişkin sinyaller iletmek üzere plazma zarının dış yaprağına yerleşir (bkz. Bölüm 18).



Şekil 14.3 Lipid yamaları Lipid yamaları, sfingomiyelin, glikolipidler ve kolesterolün etkileşimleri ile oluşur.

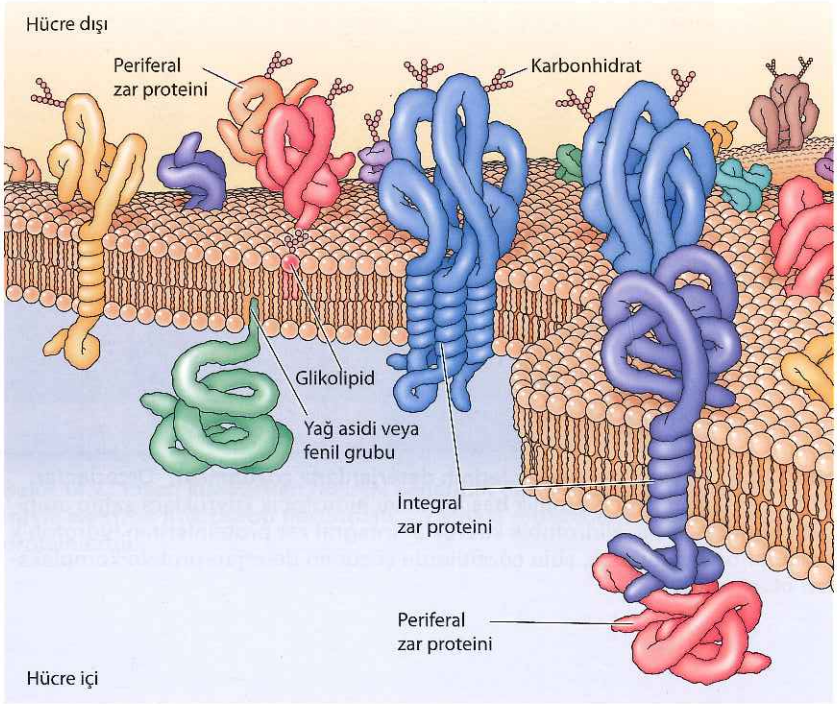
bir çok biyolojik molekül dahil suda çözünen molekülleri geçirmez. İkinci olarak, doğada var olan fosfolipidlerin oluşturduğu çift-tabakalar katı değil koyu akışkandırlar. Doğal fosfolipidlerin çoğunun yapısındaki yağ asitleri bir veya daha fazla çift bağ içerirler ve hidrokarbon zincirlerinde, bir araya paketlenmelerini güçleştiren kıvrılmalara neden olurlar. Bu nedenle yağ asitlerinin uzun hidrokarbon zincirleri zar içerisinde serbestçe hareket ederek zara yumuşaklık ve esneklik kazandırırlar. Ayrıca, hem fosfolipidler hem de proteinler zar içerisinde yana doğru serbestçe difüze olabilirler- bir çok zar işlevi için bu çok önemli bir özelliktir.

Bölüm 2'de tartışıldığı üzere kolesterol zar akışkanlığı üzerinde önemli etkilere sahiptir. Buna ek olarak, kolesterol plazma zarında çeşitli proteinlerin kümelenmesine aracılık eden membran bölgelerinin oluşumunda görev alır. Kolesterol ve sfingolipidler (sfingomiyelin ve glikolipidler), plasma zarında serbest şekilde difüze olmak yerine **lipid yığınları** olarak tanımlanan yarı katı küçük yapılar halinde kümelenme eğilimindedirler (**Şekil 14.3**). Bu bölümde daha sonra tartışılacağı üzere, lipid yığınları plazma zarının farklı fonksiyonel bölümlere ayrılmasında önemli rol oynar.

Plazma zar proteinleri

Lipidler zarların temel yapısal elemanları iken, proteinler özel zar işlevlerini yürütmekle görevlidirler. Plazma zarlarının çoğu ağırlık olarak %50 lipid ve %50 proteinden oluşurlar, glikolipid ve glikoproteinlerin karbohidrat kısımları ise zar kütlesinin %5 ile %10'unu oluşturur. Proteinler lipidlere kıyasla çok daha büyük olduklarından bu oran, yaklaşık her 50 ile 100 lipid molekülüne karşılık bir protein molekülüne denktir.

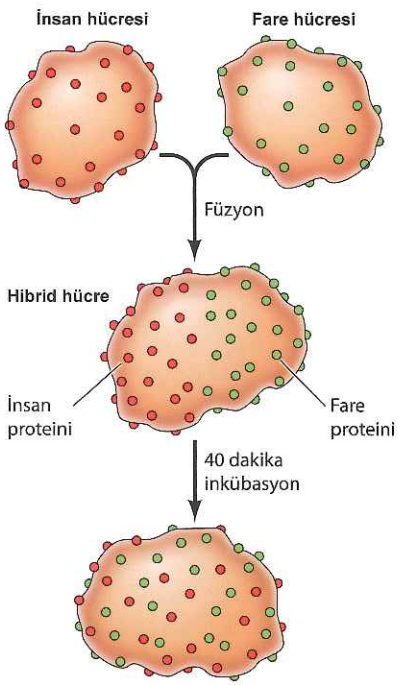
1972 yılında, Jonathan Singer ve Garth Nicholson membran yapısı için



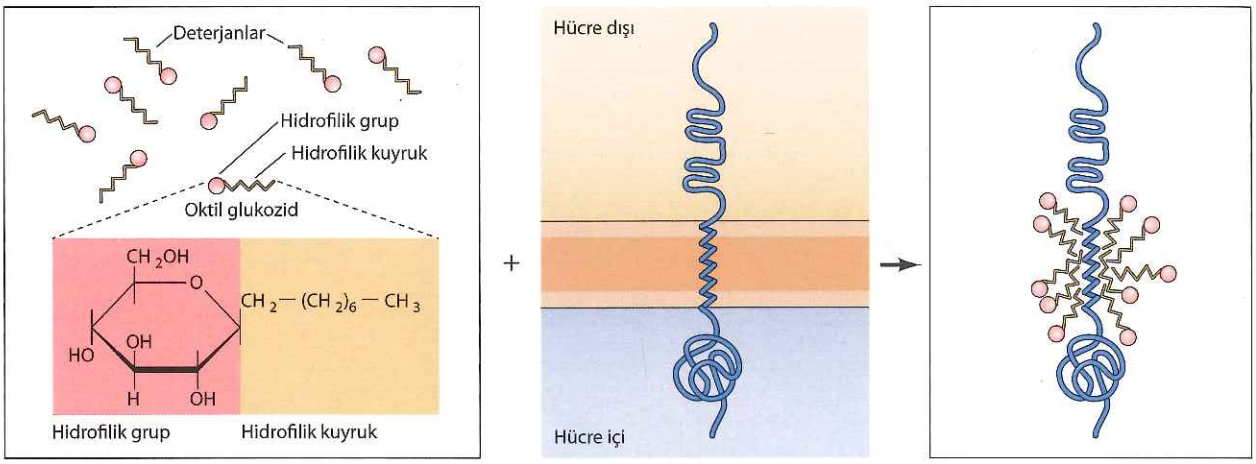
Video 14.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v14.1
Zar Akışkanlığı Plazma zarı akışkan lipid çift tabakadan oluşur.

Şekil 14.4 Plazma zarının akışkan mozaik modeli İntegral zar proteinleri lipid çift tabakasının içine yerleşirken periferal proteinler zara protein-protein ilişkileriyle, dolaylı olarak bağlanırlar. İntegral proteinlerin çoğu, lipid çift tabakasının iki yanında açık kısımları bulunan transmembran proteinlerdir. Bu proteinlerin hücre dışında kalan kısımları, zarın dış yüzüne bağlanan periferal zar proteinlerde de olduğu gibi, genellikle glikozillenmişlerdir.

akışkan mozaik modeli önermiştir. Bu modelde zarlar, lipid çift tabakası içine proteinlerin yerleştiği iki-boyutlu bir akışkan olarak görülür (Şekil 14.4). Akışkan mozaik modelinin en önemli özelliği, sıvı lipid çift tabaka yapısına dahil olduklarından proteinler ve lipidler membrandan lateral olarak difüze olabilirler. Membran proteinlerinin bu lateral hareketi ilk kez doğrudan Larry Frye ve Michael Edidin tarafından 1970'de gösterilmiştir. Frye ve Edidin fare-insan hibridini oluşturmak üzere insan ve fare hücrelerini kültürde birleştirdi (Şekil 14.5). Daha sonra insan ve fare kökenli proteinleri özgül olarak tanıyan antikorlar kullanarak bu hibrid hücrelerin zarlarındaki proteinlerin dağılımını analiz ettiler. Bu antikorlar farklı floresan boyalar ile işaretlenerek fare ve insan proteinlerinin ayırt edilebilmesi sağlandı. Füzyondan 40 dakika sonra fare ve insan proteinleri, plazma zarı boyunca serbest şekilde hareket ettiklerini gösteren şekilde hibrid hücrelerin yüzeyinde birbiri ile karıştı. Plazma zarının, sonraki bölümde tartışılacak olan birkaç



Şekil 14.5 Zar proteinlerinin hareketliliği İnsan ve fare hücreleri hibrid hücreler oluşturmak üzere birleştirildi. Daha sonra hücre yüzey proteinlerinin dağılımı, farklı floresan boyalarla işaretlenmiş anti-insan ve anti-fare (sırasıyla, kırmızı ve yeşil) kullanılarak incelendi. Birleşmeden hemen sonra insan ve fare proteinleri hibrid hücrenin farklı yerlerinde, 40 dakikalık inkübasyonu takiben ise, hücre yüzeyinde birbirine karışmış olarak saptandı.



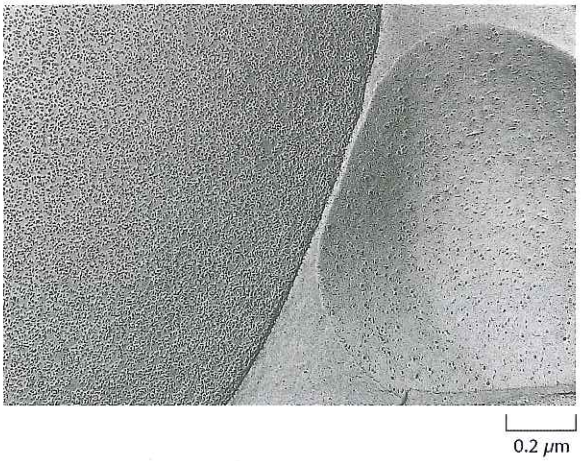
Şekil 14.6 İntegral zar proteinlerinin deterjanlarla çözünmesi Deterjanlar (örn., oktil glukozid), hidrofilik baş kısmı ve hidrofobik kuyruklara sahip amfipatik moleküllerdir. Hidrofobik kuyruklar integral zar proteinlerinin hidrofobik bölgelerine bağlanarak, sulu çözeltilerde çözünen deterjan-protein kompleksleri oluştururlar.

farklı özelleşmiş domainden oluştuğunu şu anda biliyor olmamıza rağmen akışkan mozaik model halen bütün biyolojik zarların organizasyonunda temel paradigma olarak yer almaktadır.

Singer ve Nicholson zarla-ilişkili proteinleri iki sınıfta tanımlayıp, **periferal** ve **integral zar proteinleri** olarak adlandırdılar. Periferal zar proteinleri işlemsel olarak, fosfolipid çift tabaka yapısını bozmayan, aşırı pH ya da yüksek tuz konsantrasyonu gibi polar ajanlarla işlemlemeyi takiben zardan ayrılan proteinler olarak tanımlandılar. Bir kez zardan ayrılan periferal zar proteinleri sulu tamponlarda çözünürler. Bu proteinler lipid çift tabakasının hidrofobik iç kısmına girmezler. Bunun yerine, protein-protein etkileşimleriyle zara dolaylı şekilde bağlanırlar. Bu bağlantılar çoğunlukla, aşırı pH ve yüksek tuzlarla bozulan iyonik bağlarla olur.

Periferal zar proteinlerinin aksine, integral zar proteinleri ancak fosfolipid çift tabakasını bozan işlemlerle serbestleşebilirler. Bu integral zar proteinlerinin bir kısmı lipid çift tabakası içerisine girdiğinden, sadece hidrofobik etkileşimleri bozan ajanlarla ayrılabilirler. İntegral zar proteinlerinin çözünmesi için en çok kullanılan ajanlar, hem hidrofilik hem de hidrofobik gruplara sahip küçük amfipatik moleküller olan deterjanlardır (Şekil 14.6). Deterjanların hidrofobik kısımları zar lipidlerini uzaklaştırarak integral zar proteinlerinin hidrofobik kısımlarına bağlanırlar. Deterjan molekülünün diğer ucu hidrofilik olduğundan, deterjan-protein kompleksleri sulu çözeltilerde çözünürler.

İntegral proteinlerin çoğu, zarın her iki yanında açık kısımları bulunacak şekilde lipid çift tabakasını kat eden **transmembran proteinlerdir.** Bu proteinler, dondurup-çatlatma yöntemiyle (bkz. Şekil 1.37) hazırlanan plazma



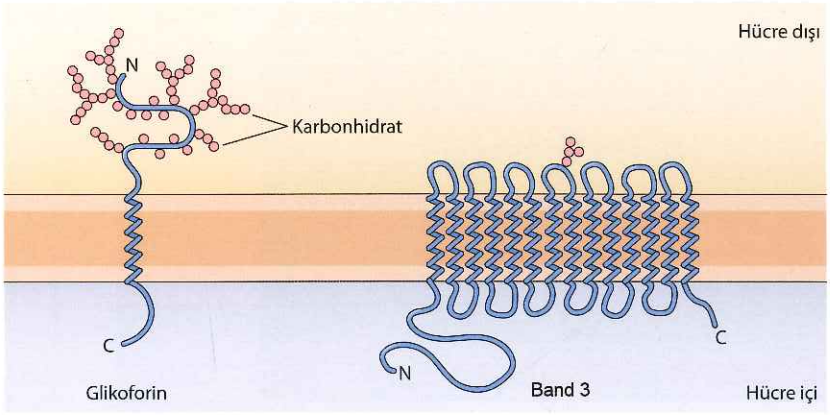
Şekil 14.7 İnsan kırmızı kan hücresi zarlarının dondurup-çatlatma yöntemiyle elektron mikroskop görüntüsü Zardaki zerrecikler transmembran proteinlerdir.

zarlarının elektron mikroskop görüntülerinde izlenebilmektedir. Bu örneklerde zar yarılarak iki yaprak halinde ayrılır. Transmembran proteinler böylece, zarın iç yüzlerinde zerrecikler şeklinde görülür (Şekil 14.7).

Transmembran proteinlerin zarı kat eden kısımları genellikle, 20 ile 25 hidrofobik amino asit içeren α sarmallardır, bunlar polipeptid zincirinin sentezi sırasında endoplazmik retikulum zarının içine yerleşirler (bkz. Şekil 11.12-11.15). Bu proteinler daha sonra zar kesecikleriyle endoplazmik retikulumdan Golgi aygıtına ve oradan da plazma zarına taşınırlar. Karbohidrat grupları polipeptid zincirlerine hem endoplazmik retikulumda hem de Golgi aygıtında eklenir, böylece, plazma zarındaki transmembran proteinlerin çoğu, oligosakkaridleri hücre yüzeyinde açık olan glikoproteinlerdir.

Kırmızı kan hücreleriyle yapılan çalışmalar, plazma zarına bağlı integral ve periferal proteinlere ait güzel örnekler sağlamıştır. İnsan alyuvar zarları, başlangıçta jel elektroforezi ile tanımlanmış olan yaklaşık bir düzine büyük protein içerir. Bunların çoğu, plazma zarının altında yer alan ve hücrenin şeklini belirleyen kortikal hücre iskeletinin (bkz. Bölüm 13) bileşenleri olarak ayrımlanan periferal zar proteinleridir. Örneğin, kırmızı kan hücrelerinde en fazla bulunan periferal protein, alyuvar hücre iskeletinin temel proteini olan spektrindir. Kırmızı kan hücrelerinin diğer periferal zar proteinleri arasında, aktin, ankirin ve band 4.1 bulunur. Ankirin, spektrine ve integral zar proteini band 3'e bağlanarak plazma zarıyla hücre iskeleti arasında ana bağlantı görevi yapar (bkz. Şekil 13.13). Zar ile hücre iskeleti arasındaki diğer bir bağlantı da, spektrin ve aktin kavşağına ve aynı zamanda glikoforine (alyuvarlarda bulunan diğer bir temel integral zar proteini) bağlanan band 4.1 ile sağlanır.

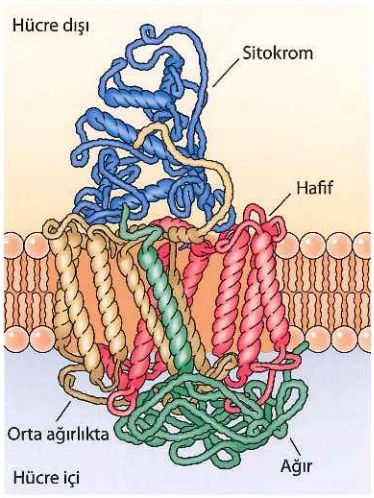
Kırmızı kan hücrelerinin temel integral zar proteinleri olan glikoforin ve band 3, transmembran protein yapısı açısından iyi incelenmiş örneklerdir



Şekil 14.8 Kırmızı kan hücrelerinin integral zar proteinleri Glikoforin, dimer yapıda olup her bir polipeptid zincirinde 131 amino asit ve tek transmembran α sarmalı bulunur. Polipeptid zincirinin hücre dışında kalan kısmında 16 bölgeye bağlanan oligosakkaridlerle, yoğun biçimde glikozillenmiştir. Band 3 (929 amino asit) çok sayıda transmembran α sarmala sahiptir ve zarı 14 kez geçtiği düşünülmektedir.

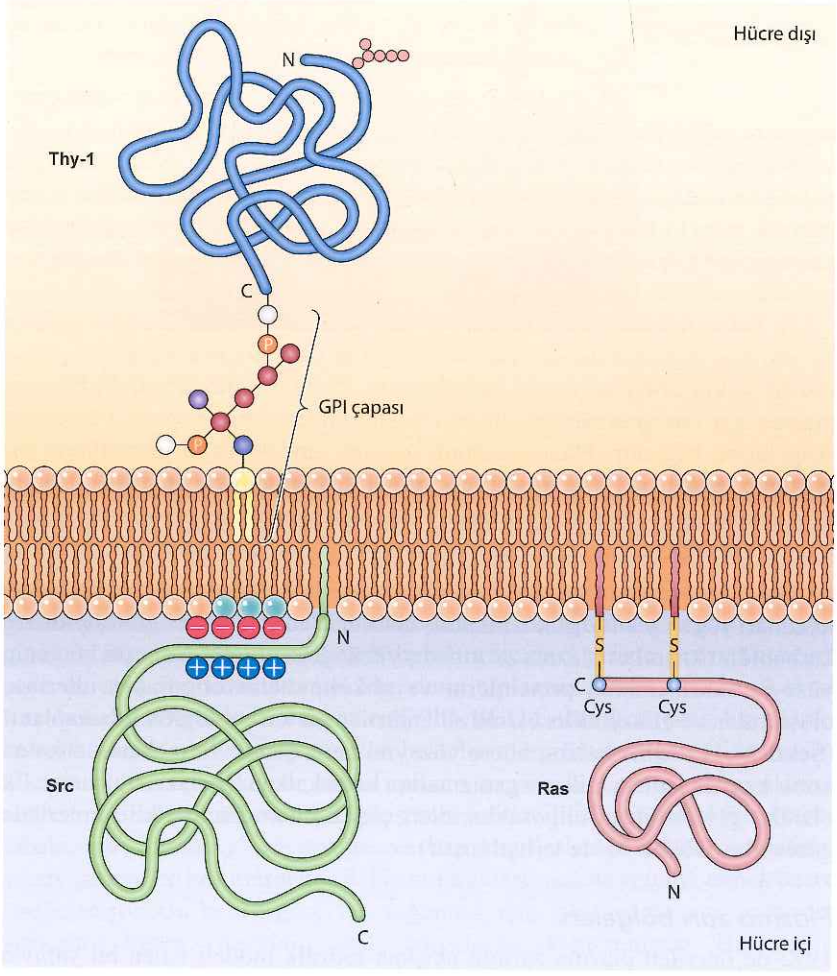
(Şekil 14.8). Glikoforin, 131 amino asit uzunluğunda moleküler ağırlığı 30,000 civarında olan ve membran boyunca 23 amino asitlik tek bir α-sarmal yapısı içeren küçük bir glikoproteindir. Bu yapı içerisinde yoğun şekilde glikolizasyon bölgeleri bulunuyor olup yaklaşık %50 oranında karbohidrat içermektedir. Polipeptid zincirin glikozilenmiş amino ucu ise hücre yüzeyinde sergilenir. Kırmızı kan hücrelerinin bir diğer temel transmembran zar proteini olan band 3, kırmızı kan hücrelerinin zarından bikarbonat (HCO_3^-) ve klorid (Cl^-) iyonlarının geçişinden sorumlu olan anyon taşıyıcısıdır. Band 3 polipeptid zinciri 929 amino asit uzunluğunda olup zar boyunca ilerleyen 14 α-sarmal bölgesine sahiptir. Zarın içinde band 3 dimerleri, iyonların lipid çift tabaka boyunca hareket edebildiği iç kanallara sahip olan küresel yapılar oluşturur.

Amfipatik özellikleri ve izolasyonları için deterjan gerektiğinden transmembran proteinlerin, X-ışını kırılımı yöntemiyle üç-boyutlu yapı analizi için gerekli olan kristalleştirilmeleri oldukça zordur. Ancak bu alandaki ilerlemeler sayesinde günümüzde 400'den fazla zar proteinine ait kristal yapı tanımlanmıştır. X-ışını kristallografisi ile incelenen ve yapısı 1985'de yayınlanan ilk transmembran protein, *Rhodopseudomanas viridis* bakterisinin fotosentetik reaksiyon merkezidir (Şekil 14.9). Reaksiyon merkezi, jel elektroforezi ile belirlenen büyüklüklerine göre, L, M, ve H (hafif, orta ve ağır) olarak adlandırılan üç transmembran protein içerir. L ve M alt birimlerinin her ikisi de, zarı kat eden beş α sarmal içerir. H alt birimi tek bir transmembran α sarmala sahiptir ve polipeptid zincirinin büyük bölümü zarın sitozolik tarafındadır. Reaksiyon merkezinin dördüncü alt birimi, komplekse protein-protein ilişkisiyle bağlı bir periferal zar proteini olan sitokromdur.

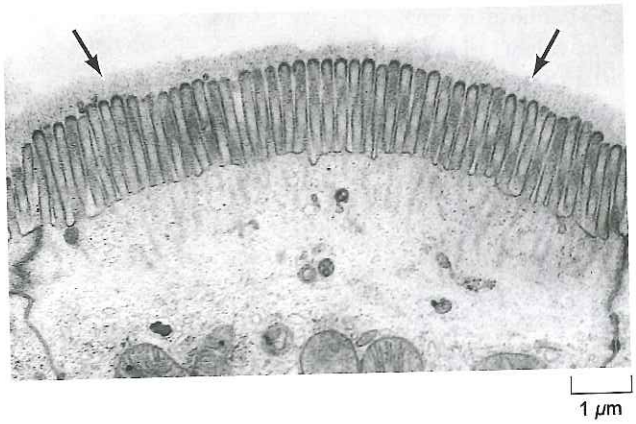


Şekil 14.9 Bakteri fotosentetik tepki merkezi *Rhodopseudomonas viridis* reaksiyon merkezi, hafif (kırmızı), orta (sarı) ve ağır (yeşil) olarak tanımlanan üç farklı transmembran proteininden oluşur. L ve M alt birimlerinin her biri beş transmembran α sarmalına sahipken, H alt biriminde sadece bir adet bulunur. Reaksiyon merkezinin dördüncü alt birimi çevresel bir zar proteini olan sitokromdur (mavi).

Transmembran proteinlerin aksine çeşitli proteinler (bunların çoğu integral zar proteinleri gibi davranır) plazma zarına kovalent olarak bağlandıkları lipidler ya da glikolipidler aracılığıyla tutunurlar (**Şekil 14.10**). Bu proteinlerin bir sınıfının üyeleri plazma zarının dış yaprağına **glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapaları** aracılığıyla tutunur. GPI çapaları, endolazmik retikulumun içine aktarılan ve zara, C-ucu transmembran bölümleri aracılığıyla katılan belirli proteinlere eklenir (bkz. Şekil 11.18). GPI çapası eklenirken transmembran bölge kesilir ve protein zara sadece glikolipid



Şekil 14.10 Lipid ve glikolipidler tarafından plazma zarı içerisine sabitlenmiş protein örnekleri Bazı proteinler (örn., lenfosit proteinThy-1) endoplazmik retikulum içerisindeyken C uçlarına eklenen GPI kancaları ile hücre zarının dış yüzeyine tutunur. Bu proteinler glikozillenir ve hücre zarının üzerinde bulur. Diğer proteinler sitozolik serbest ribozomlardaki translasyonlarını takiben hücre zarının iç yüzeyine tutunur. Src proteini ise N-ucuna takılı olan miristol grubu ile membrana tutunur. Src'ın aynı zamanda pozitif yüklü bir bölgesi de olasılıkla negatif yüklü fosfatidilserin baş grupları ile etkileşerek membrana tutunmada rol oynar. Şekilde gösterilen Ras proteini, C-ucundaki sistein yan zincirine takılı prenil grubu ve bunun 5 amino asit üzerindeki sisteine takılı olan palmitol grubu membrana tutunur. Bu lipid ve glikolipid gruplarının yapıları Şekil 9.34-9.37 arasında resmedilmiştir.



Şekil 14.11 Glikokaliks Barsak epiteline ait, glikokaliksin (oklar) görüldüğü bir elektron mikroskop fotoğrafı.

aracılığıyla bağlı kalır. GPI-eklenmiş proteinlerin polipeptid zincirleri endoplazmik retikuluma aktarıldıkları için glikozillenirler ve plazma zarına taşındıklarında hücre yüzeyinde sergilenirler.

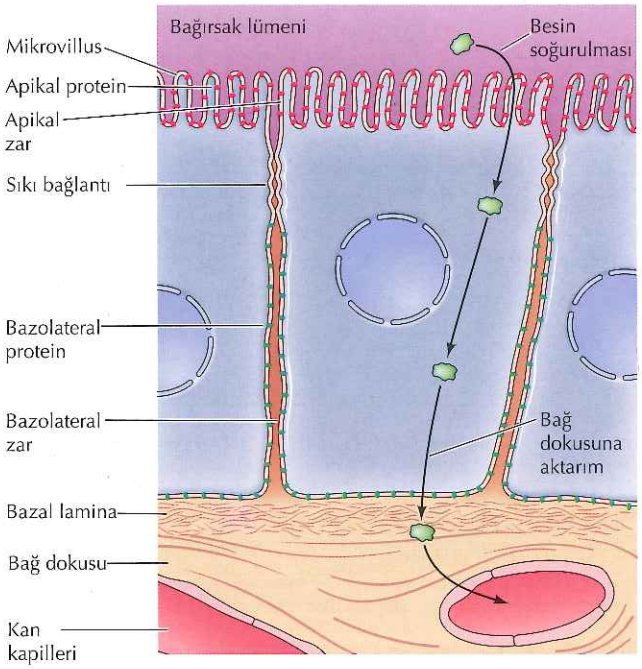
Diğer proteinler plazma zarının iç yaprağına, kovalent bağlı lipidler aracılığıyla tutunurlar. Salgı yolağında işlenmek yerine sitoplazmadaki serbest ribozomlarda yapılan bu proteinler daha sonra lipid eklenerek değiştirilirler. Bu değişiklikler; polipeptid zincirinin amino ucuna miristik asit (14 karbonlu bir yağ asidi), sistein birimlerinin yan zincirlerine palmitik asit (16 karbonlu) ve karboksil ucundaki sistemlerin yan zincirlerine prenil gruplarının (15 veya 20 karbonlu) eklenmesini kapsar (bkz. Şekil 9.35-9.37). Bu proteinler (periferal zar proteini gibi davrananların çoğu) plazma zarına, bazı durumlarda, eklenmiş olan lipidin yanı sıra polipeptid zincirinin pozitif yüklü bölgeleriyle de hedeflenirler. Proteinin pozitif yüklü bölümü plazma zarının sitozolik yüzündeki fosfatidilserinlerin negatif yüklü baş bölgelerine bağlanır. Plazma zarının iç yaprağındaki bağlı proteinlerin bir çoğunun (Şekil 14.10'de gösterilen Src ve Ras proteinleri de dahil), Bölüm 16'da anlatıldığı şekilde, uyarıların hücre yüzeyindeki reseptörlerden hücre içindeki hedeflere iletilmesinde önemli rol oynadıklarını belirtmek gerekir.

Daha önceden tartışıldığı üzere, plazma zar proteinlerinin hücre dışındaki kısımları yoğun şekilde glikozillenmiş olabilir. Benzer şekilde, glikolipidlerin karbohidrat kısımları plazma zarının dış yüzünde sergilenir. Sonuçta hücrenin yüzeyi, transmembran proteinlerin ve glikolipidlerin oligosakkaridlerince oluşturulan ve **glikokaliks** olarak adlandırılan bir karbohidrat kılıfla kaplanır (**Şekil 14.11**). Glikokaliks, hücre yüzeyini hem iyonik ve mekanik stresten korur hem de istilacı mikroorganizmalara karşı kalkan (bariyer) oluşturur. Ek olarak, glikokaliksin oligosakkaridleri çeşitli hücre-hücre etkileşimlerinde görev alır (Bölüm 15'de tartışılmıştır).

Plazma zarı bölgeleri

1972'de önerilen plazma zarının akışkan mozaik modeli halen bu yapıyla ilgili olarak bildiklerimizin temelini oluşturmaya devam etmektedir. Ancak son 40 yılda gerçekleşen ilerlemeler plazma zarının oluşumundaki algımızda değişikliklere neden oldu. Özellikle, ilk önerilen akışkan mozaik modelinde zarlar çift katmanlı lipid yapısında proteinlerin serbestçe hareket ettiği yoğun akışkanlar halinde görünüyordu. Ancak, günümüzde birçok plazma zar proteininin hareketinin kısıtlı olduğunu ve zarların tek bir form yerine önemli yapısal ve fonksiyonel görevlere sahip farklı bölgelerden oluştuğunu biliyoruz.

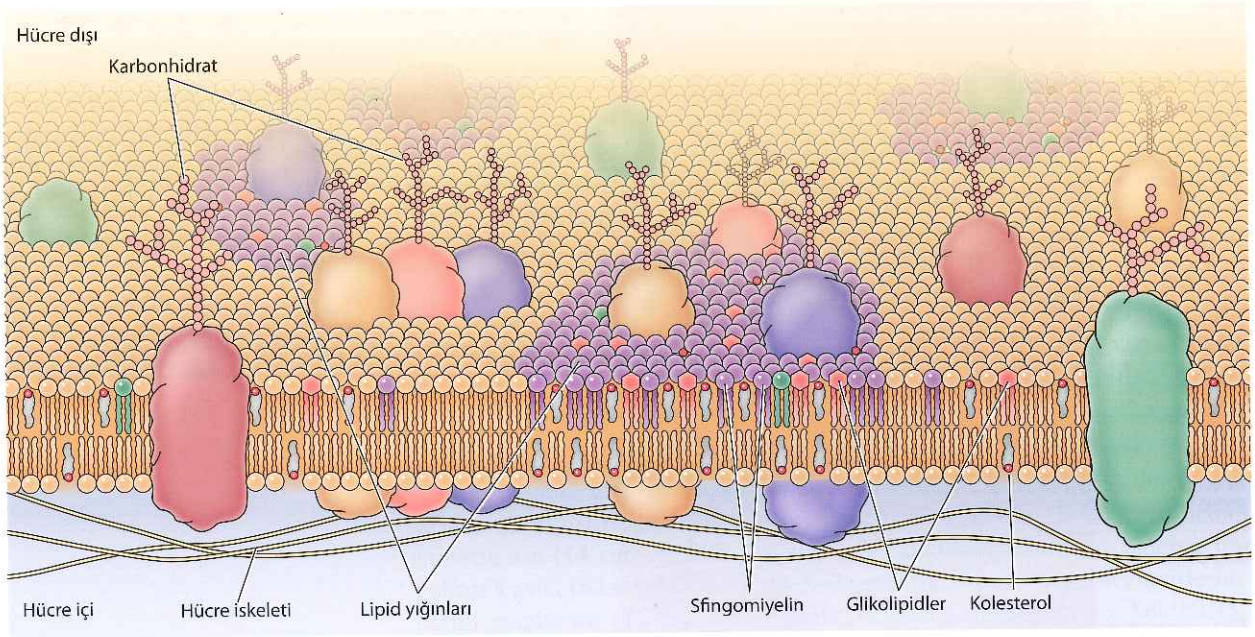
Birçok hücre, plazma zarlarının belirli görevleri yerine getirmekten sorumlu farklı bölgeleri ile polarize haldedir. Bunun en temel örneği vücudun yüzeyini tabaka şeklinde kaplayan ve iç organları çevreleyen epitel



Şekil 14.12 Polarize olmuş bir barsak epitel hücresi Hücrenin apikal yüzeyi mikroviluslar içerir ve barsak lümeninden besinlerin soğurulması için özelleşmiştir. Hücrenin bazolateral yüzeyi, soğurulan besinleri, kan damarları içeren alttaki bağ dokusuna aktarmak üzere özelleşmiştir. Sıkı bağlantılar plazma zarının apikal ve bazolateral alanlarını birbirinden ayırır. Zar proteinleri her alan içerisinde yayılmakta özgürdür ancak, bir alandan diğerine geçemezler.

hücreleridir. Memelilerde, koruma (deri), besinlerin alınımı (barsak epitel hücreleri) ve salgılama (meme bezi epitel hücreleri) gibi herbiri belirli bir görev için özelleşmiş olan 100'den farklı çeşit epitel hücre bulunur. Epitel tabaka üzerinde belirli bir yönde besinlerin alınımı ve salgılamanın gerçekleşebilmesi için epitel hücreleri dokuları oluşturmak üzere bir araya gelirken hücrenin farklı bölgeleri belirli görevleri yerine getirmek üzere polarize olur. Bu nedenle epitel hücrelerinin plazma zarları farklı **apikal** ve **bazolateral bölgelere** ayrılmıştır (Şekil 14.12). Örneğin, ince barsaktaki epitel hücreler sindirim kanalından besinlerin emiliminde görevlidirler. Bu hücrelerin barsak boşluğuna bakan apikal yüzeyleri bu nedenle yüzey alanını arttıran ve besin emilimini kolaylaştıran miktovilluslar ile kaplıdır. Hücre tabakasının altındaki bağ dokusu ve kan kapillerlerine bakan bazolateral yüzey ise emilen besinlerin kan dolaşımına aktarılmasına aracılık etmek üzere özelleşmiştir. Bu belirli görevleri sağlamak için, plazma zar proteinlerinin yerleşimi hücre yüzeyinin ilgili bölgelerine kısıtlanmıştır. Bu olayın gerçekleşmesi için gerekli olan mekanizmalardan bir tanesi epitel yapının yanyana olan hücreleri arasındaki sıkı bağların oluşumudur (Bölüm 15'te tartışılmıştır). Bu hücreler sadece hücreler arası boşluğu kapatmakla kalmaz zar lipid ve proteinlerinin hareketine engel oluşturur. Bu sayede proteinler ya apikal ya da bazolateral bölgeler arasında dağılım gösterebilir ancak bir bölgeden diğerine geçiş yapamazlar. Birçok plazma zar proteinlerinin hareketi hücre iskeleti ya da özelleşmiş lipid bölgeleri ile bağlantılarının sonucu olarak kısıtlıdır.

Zar proteinlerinin hareketliliklerindeki bu kısıtlamalar plazma zar yapısına ait hücre iskeleti ile bağlantılar ve lipid-protein etkileşim bölgelerinin dahil olduğu yeni modellerin gelişmesine yol açtı (Şekil 14.13). Örneğin alyuvar

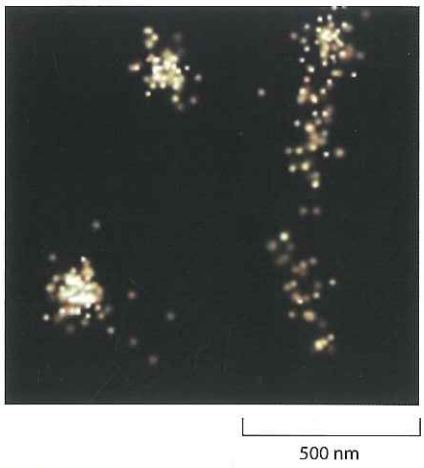


Şekil 14.13 Güncellenmiş akışkan mozaik model Plazma zarının, lipid yığınları ve transmembran proteinlerinin altlarındaki aktin hücre iskeletiyle etkileşimini gösteren güncellenmiş modeli (G. L. Nicolson, 2014. *Biochim. Biophys. Acta* 1838: 1451).

Video 14.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v14.2
Lipid Yığınlarının Devri Lipid yığınlarının kolesterol ve sfingolipidlerden oluşan plazma zarı üzerindeki küçük, geçici, yarı katı bölgelerdir.

hücrelerinin temel transmembran proteinleri (glikoforin ve band 3, bkz. Şekil 14.8) plazma zarının altında bulunan spektrin-aktin kortikal hücre iskeleti ile bağlantılıdır (bkz. Şekil 13.13). Bunun sonucunda, bu proteinler lipid çift tabaka üzerinde serbest şekilde hareket edemezler. Hücre iskeleti ile sabitlenen transmembran proteinleri sadece kendi hareketleri bakımından kısıtlanmış değillerdir. Diğer zar proteinlerinin de hareketini kısıtlayan bariyerler olarak görev görürler. Komşu hücrelerin yüzeyindeki proteinler ya da ekstrasellüler matriks ile etkileşimleri de bazı transmembran proteinlerinin hareketliliğini kısıtlar.

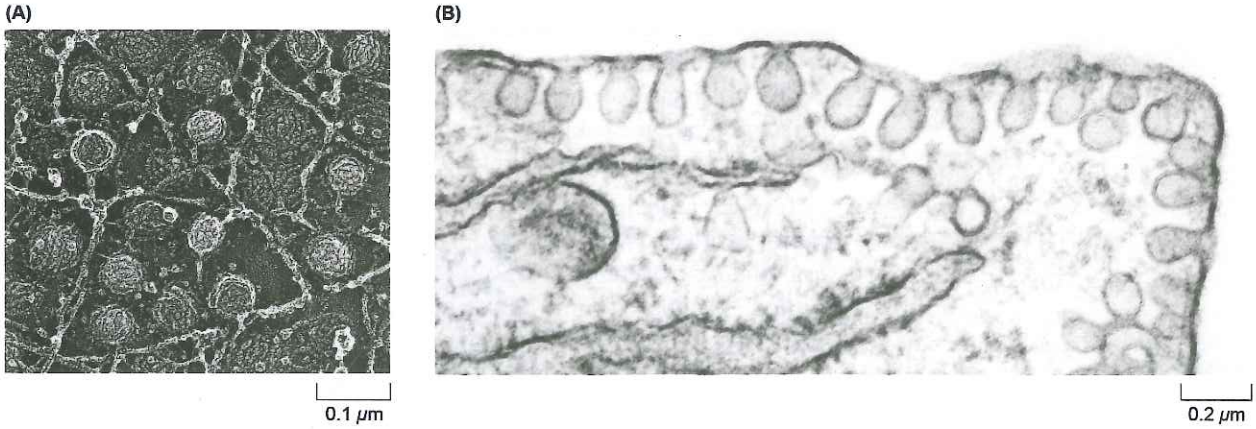
Bazı zar proteinlerinin serbest difüzyonu özelleşmiş lipid domainlerine bağlanmaları ile kısıtlanır. Daha önce de bahsedildiği üzere, sfingomiyelin, glikolipid ve kolesterol **lipid yığınları** olarak adlandırılan kümelenmiş bölgeler oluşturur (bkz. Şekil 14.3). Lipid yığınları küçük (10-200 nm) ve proteinlerin etkileşimlerini kolaylaştırmak üzere kümelendiği geçici yapılardır (bkz. Şekil 14.13). Bu yapılar, hücre sinyalleşmesi, hücre hareketi, ve endositoz dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonlarda görev alan GPI kancalı proteinler ve transmembran proteinleri üzerinde bol miktarda bulunur. Lipid yığınlarını incelemek zordur çünkü küçük boyutları standart ışık mikroskobunun 200 nm'lik rezolüsyon limitinin altında kalmaktadır (Bölüm 1'de tartışılmıştır). Ancak süper-rezolüsyon mikroskopisine ilişkin yakın geçmişte geliştirilen yöntemler 10-100 nm aralığında rezolüsyon sağlamakta (bkz. Şekil 1.39) olup canlı hücreler üzerinde lipid yığınlarının görüntülenmesini mümkün kılmıştır



Şekil 14.14 Lipid yığınlarının süper-çözünürlüklü mikroskop görüntüsü Lipid yığınlarının, kolesterole özgü floresan probile görüntülenmiştir (H. Mizuno et al., 2011, *Chern. Sci.* 2:1548).

(Şekil 14.14). Lipid yığınları aynı zamanda kendilerini sabitleyen ve plazma zarını özelleşmiş bölgelere ayıran hücre iskeleti ile de etkileşir.

Kaveola (Latincede "mağaracıklar" anlamında) ilk olarak elektron mikroskobu ile plazma zarının 60-80 nm boyutunda girintileri şeklinde tanımlanmış olup lipid yığınlarının bir alt kümesidir (Şekil 14.15). Bu yapı, sitoplazmik kavin proteini ile etkileşen kaveolin zar protein oligomerlerinden oluşur. Kaveolin ayrıca kolesterol ile de etkileşir ve kaveolanın oluşumu için yüksek miktarda membran kolesterolü gereklidir. Plazma zarındaki kaveola sayısı farklı çeşit hücrelerde oldukça değişkendir: bazı hücrelerde belirgin kaveola yapısı bulunmazken diğer hücre çeşitlerinde bol miktarda mevcuttur. Örneğin endotel hücreleri ve adipositlerin plazma zarının yarısını oluşturmaktadır. Endositoz, hücre sinyal iletimi, lipid taşımasının



Şekil 14.15 Kaveola Kaveolaya ait elektron mikroskop görüntüleri. (A, John E. Heuser'in katkısı, Washington University School of Medicine; B, R. G. W. Anderson'un katkısı/University of Texas South Western Medical School, Dallas)

düzenlemesi ve plazma zarının mekanik stresten korunması gibi çeşitli hücresel aktivitelerde yer alır. Kaveolanın bunlar gibi ve diğer potansiyel görevleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır ve aktif araştırma alanları olarak bulunmaktadır.

Küçük Moleküllerin Taşınması

Hücrenin içeriği, plazma zarının küçük moleküllere seçici geçirgen olması sayesinde korunur. Bölüm 2'de tartışıldığı üzere, sadece gazlar (O_2 ve CO_2), hidrofobik moleküller (steroid hormonlar) ve küçük polar ancak yüksüz moleküller (H_2O ve etanol gibi) plazma zarı üzerinden pasif olarak difüzyona uğrayabilir (bkz. Şekil 2.36). Glukoz gibi yüksüz, daha büyük polar moleküller, herhangi bir boyuttaki yüklü moleküller (amino asitler, H^+, Na^+, K^+, Ca^{2+} ve Cl^-) plazma zarı üzerinden pasif difüzyon ile geçemezler. Bunun yerine, bu moleküllerin zar üzerinden geçişi birçok molekülün hücreye giriş ve çıkışını kontrol eden spesifik taşıma ve kanal proteinlerinin aktivitesini gerektirir.

Kolaylaştırılmış difüzyon ve taşıyıcı proteinler

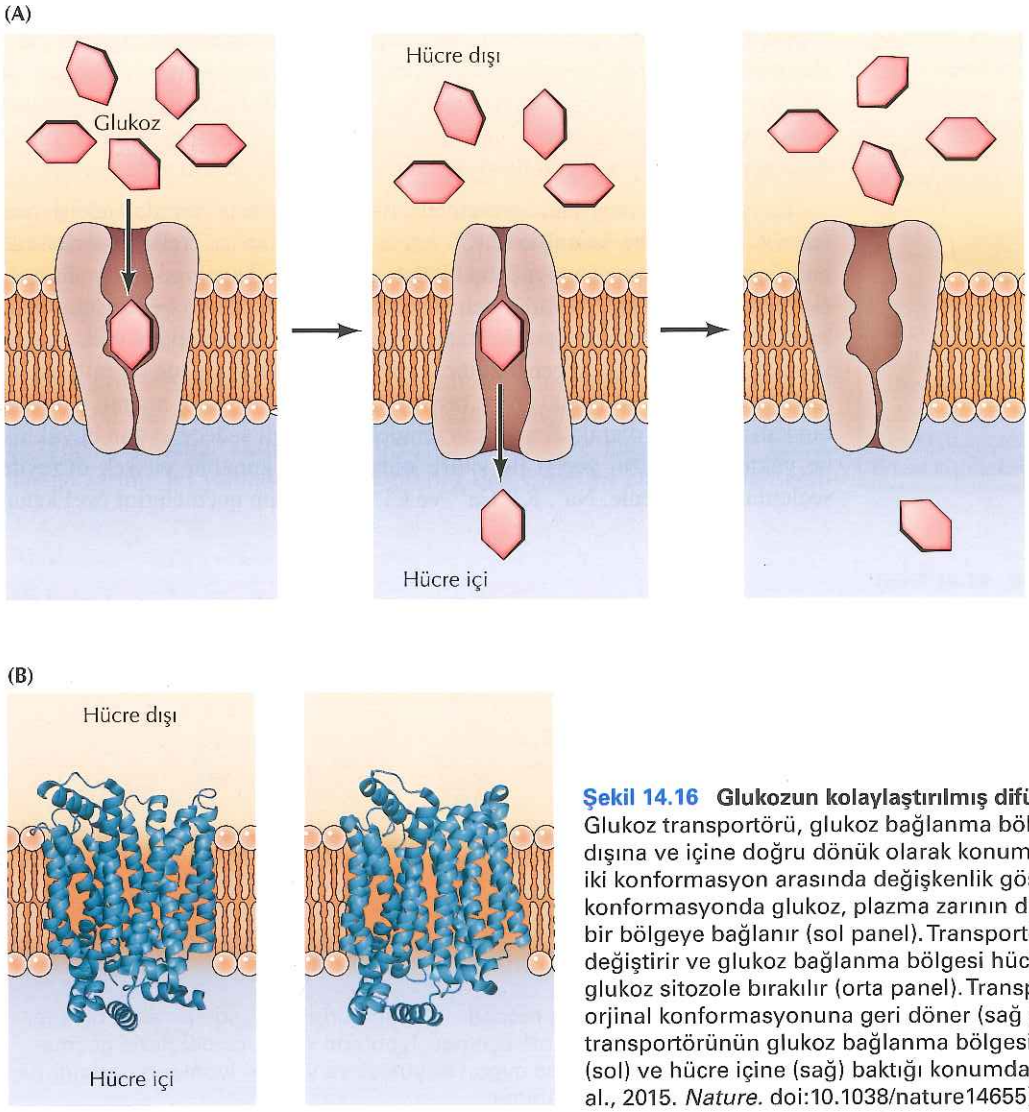
Kolaylaştırılmış difüzyon, moleküllerin, hücre içindeki ve dışındaki göreli konsantrasyonlarının belirlediği yönde hareketini kapsar. Dışarıdan enerji sağlanması gerekmez, moleküller, konsantrasyon gradientlerinin veya yüklü moleküller için zardaki elektrik potansiyelinin belirlediği yönde zardan geçerler. Ancak, kolaylaştırılmış difüzyon, taşınan moleküllerin fosfolipid çift tabakada çözünmeyişi ile pasif difüzyondan ayrılır. Bunun yerine, geçişleri, taşınan moleküllerin zarın hidrofobik iç kısmıyla direkt etkileşime girmeden geçmelerine olanak veren proteinler aracılığıyla olur. Bu sayede kolaylaştırılmış difüzyon, karbohidratlar, amino asitler, nükleotidler ve iyonlar gibi polar ve yüklü moleküllerin plazma zarını geçmelerini sağlar.

Genel olarak, kolaylaştırılmış difüzyona aracılık eden iki protein grubu belirlenmiştir: taşıyıcı proteinler ve kanal proteinleri. **Taşıyıcı proteinler,** taşınacak olan spesifik moleküle zarın bir tarafında bağlanırlar. Daha sonra, molekülün zardan geçmesine ve öte yanda serbest kalmasına olanak verecek şekilde bir yapısal değişikliğe uğrarlar. Bunun aksine **kanal proteinleri** (bir sonraki bölüme bakınız), zarın içinde, uygun büyüklük ve yükteki tüm moleküllerin serbestçe difüze olmasına olanak veren geçitler oluştururlar.

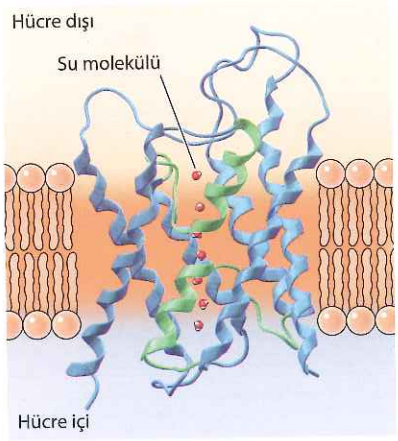
Taşıyıcı proteinler, birçok hücrenin plazma zarlarından; şekerlerin, amino asitlerin ve nükleozidlerin kolaylaştırılmış difüzyonundan sorumludurlar. Metabolik enerjinin başlıca kaynağını oluşturan glukozun alınımı, plazma zarının en önemli taşıma işlevlerinden biridir ve glukoz taşıyıcısı, iyi tanımlanmış bir taşıyıcı protein örneğidir. Glukoz transportörleri glukoz, fruktoz ve ilişkili moleküller için benzer özellikler içeren 14 proteinlik bir ailedir. Bu yapılar birçok taşıyıcı proteine özgü olan 12 α-sarmal transmembran segment içerir. Bu transmembran α-sarmallar baskın olarak hidrofobik amino asitler içerir fakat, bir kaçı aynı zamanda polar amino asitlere de sahiptir ki bunların, proteinin iç kısmında glukoz bağlanma bölgelerini oluşturdukları düşünülmektedir. Glukoz

transportörleri fonksiyonlarını iki farklı konformasyonel yapı arasında değişkenlik göstererek gerçekleştirir (**Şekil 14.16**). İlk konformasyonda, glukoz bağlanma bölgesi hücre dışına bakmaktadır. Glukozun dış kısma bağlanması taşıyıcı üzerinde konformasyonel değişikliğe neden olur ve glukoz bağlanma bölgesi hücre içerisine yönelir. Sonrasında glukoz sitozole bırakılır ve takiben glukoz taşıyıcısı ilk konformasyonuna geri döner.

Eritrositler dahil birçok hücre, hücre içindekinden daha yüksek bir hücre dışı glukoz konsantrasyonu ile karşı karşıyadır, bunun sonucunda, kolaylaştırılmış difüzyon glukozun içeri doğru net taşınımı ile sonlanır. Glukoz bu hücreler tarafından bir kez içeri alınınca süratle metabolize olur, böylece hücre içi glukoz düzeyi düşük kalır ve glukozun hücre dışı sıvılardan hücre içine taşınması sürer. Ancak, glukoz taşıyıcının yapısal değişimi geri dönüşümlü olduğundan, Şekil 14.16'daki aşamaların basitçe ters çalıştırılması ile glukoz aksi yöne doğru taşınabilir. Bu şekilde ters akış, örneğin, glukozun sentezlenerek dolaşıma verildiği karaciğer hücrelerinde



Şekil 14.16 Glukozun kolaylaştırılmış difüzyonu (A) Glukoz transportörü, glukoz bağlanma bölgesinin hücre dışına ve içine doğru dönük olarak konum değiştirdiği iki konformasyon arasında değişkenlik gösterir. Birinci konformasyonda glukoz, plazma zarının dışında sergilenen bir bölgeye bağlanır (sol panel). Transportör daha sonra şekil değiştirir ve glukoz bağlanma bölgesi hücre içine yönelir ve glukoz sitozole bırakılır (orta panel). Transportör daha sonra orjinal konformasyonuna geri döner (sağ panel). (B) Glukoz transportörünün glukoz bağlanma bölgesinin hücre dışına (sol) ve hücre içine (sağ) baktığı konumda yapısı (B,D. Deng et al., 2015. *Nature*. doi:10.1038/nature14655).



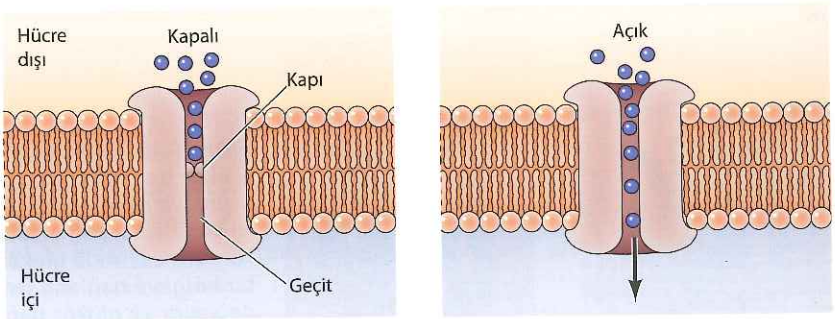
Şekil 14.17 Akuaporinlerin yapısı Akuaporinler, zar boyunca dar bir aköz kanal oluşturan altı transmembranal α-sarmala (mavi) sahiptir. İki halka bölgesi kanal içine katlanan yarım sarmal yapısını (yeşil) oluşturur. Kanal, tek sıralı olarak sadece su moleküllerinin geçişine izin veren (kırmızı) ve yüklü iyonları dışarıda tutan dar bir pora sahiptir.

görülür. Bazı glukoz taşıyıcıları diğer moleküller ile etkileşerek düzenlenir. Bunlardan bir tanesi olan GLUT4, metabolik sendrom ve diyabet ile ilişki glukoz taşıyıcısı olduğundan üzerinde yoğun şekilde çalışılmaktadır.

İyon kanalları

Taşıyıcı proteinlerin aksine kanal proteinleri, uygun büyüklük ve yükteki küçük moleküllerin fosfolipid çift tabakadan serbestçe geçebilmelerine olanak veren açık delikler oluştururlar. Kanal proteinlerinin bir grubu, daha önce bahsedilmiş olan ve bakteri, mitokondri ve kloroplast dış zarından iyonlarla küçük polar moleküllerin serbestçe geçmelerine izin veren porinlerdir (bkz. Bölüm 12). Bölüm 15'de daha sonra ele alınacak olan aralık bağlantılar da, bitişik hücreler arasında moleküllerin geçişine olanak veren kanal proteinleri içerirler. Bir çok hücrenin plazma zarları su kanal proteinleri (**akuaporin**) de içerirler ki su molekülleri zarı, bu kanallar aracılığıyla, fosfolipid çift tabakadan difüzyonla geçişlerinden çok daha çabuk geçebilirler (**Şekil 14.17**). Su kanal proteinleri genellikle epitel hücre tabakaları üzerinden su akışını hızlandırır. Bitki hücrelerinde su kanal proteinleri, kökten su taşınması ve yapraklar üzerinde gerçekleşen terlemenin düzenlenmesinde görev alır. Hayvan hücrelerinde bu proteinler, beyinde su seviyesini korur ve deriden ter çıkışının sağlar. Bütün su kanal proteinleri önemli bir özelliği, yüklü iyonlara karşı geçirgen olmamalarıdır. Bu nedenle su kanal proteinleri, plazma zarındaki elektrokimyasal dengeyi etkilemeden serbest su geçişine izin verir.

En iyi tanımlanmış kanal proteinleri, iyonların plazma zarından geçişlerine aracılık eden **iyon kanallarıdır.** İyon kanalları tüm hücrelerin zarlarında bulunmalarına rağmen en iyi çalışıldıkları yer, kontrollü açılıp kapanmalarının elektrik sinyallerinin iletiminden sorumlu olduğu sinir ve kastır. İyon kanallarının üç özelliği işlevlerinin temelini oluşturur (**Şekil 14.18**). İlk olarak, kanallardan geçiş son derece hızlıdır. Açık kanallardan saniyede bir milyondan fazla iyon akışı olur–bu akış hızı, taşıyıcı proteinlerle taşınım hızının yaklaşık bin katıdır. İkinci olarak, Kanalların içindeki dar geçit sadece uygun büyüklük ve yükteki iyonların geçişi ile sınırlı olduğundan, kanallar yüksek düzeyde seçicidir. Bu nedenle, Na^+, K^+, Ca^{2+} ve Cl^- 'un zardan geçmelerini özel kanal



Şekil 14.18 Bir iyon kanalı modeli Kapalı durumda iyonların akışı bir kapı tarafından engellenir. Kapının açılması iyonların kanal içinden hızla geçmesine izin verir. Kanal, sadece uygun büyüklük ve yükteki iyonların geçişini sınırlayan dar bir geçide sahiptir.

proteinleri sağlar. Üçüncü olarak, iyon kanallarının çoğu sürekli açık değildir. Onun yerine, iyon kanallarının açılması, özel sinyallere yanıt olarak kısa süreli açılan "kapılar" tarafından düzenlenir. Bazı kanallar **(ligand-kapılı kanallar)** sinirsel ileticilerin (nörotransmiter) ya da başka uyarıcı moleküllerin bağlanmasına yanıt olarak; diğerleri **(voltaj-kapılı kanallar)** ise, plazma zarında elektrik potansiyeli değişimlerine yanıt olarak açılırlar.

İyon kanallarının, elektriksel uyarıların iletimindeki önemli rolleri, Alan Hodgkin ve Andrevv Huxley'in 1952'de yayınladıkları bir dizi güzel deneyle aydınlatılmıştır. Bu araştırmacılar, mürekkep balığının dev sinir hücrelerini model olarak kullandılar. Dev nöronların akson çapının 1 mm olması, elektrot yerleştirilerek sinir uyarılarının iletilmesi sırasında zar potansiyeli değişimlerinin ölçülebilmesine olanak verir. Hodgkin ve Huxley bu yaklaşımla, zardaki bu potansiyel değişikliklerinin, plazma zarındaki Na^+ ve K^+ kanallarının denetimli biçimde açılıp kapanmalarının sonucu olduğunu gösterdiler.

Tablo 14.2 Ekstraselüler ve Hücre İçi İyon Konsantrasyonları

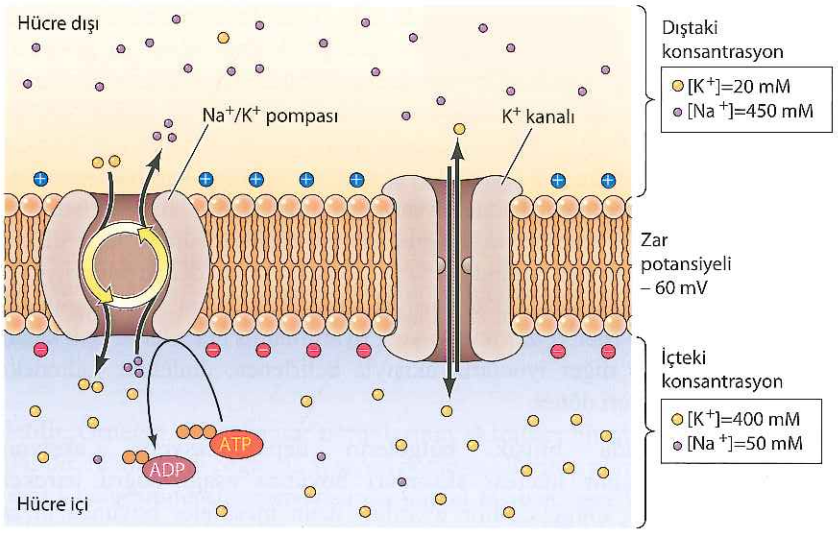
	Konsantrasyon (mM)	
İyon	**Hücre içi**	**Hücre dışı**
Kalamarın Aksonu		
K^+	400	20
Na^+	50	450
Cl^-	40–150	560
Ca^{2+}	0,0001	10
Memeli hücresi		
K^+	140	5
Na^+	5–15	145
Cl^-	4	110
Ca^{2+}	0,0001	2,5–5

İyonların zardaki kanallardan akışı, plazma zarının iki yanında iyon gradiyentinin oluşmasına bağlıdır. Sinir ve kas dahil tüm hücreler, iyonları plazma zarından aktif olarak taşımak için ATP'nin hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanan iyon pompalarına (bir sonraki kısımda tartışılıyor) sahiptirler. Sonuç olarak, sitoplazmanın iyon konsantrasyonu hücre dışı sıvılarınkinden oldukça farklıdır. (**Tablo 14.2**). Örneğin, K^+ hücre içine pompalanırken Na^+ aktif olarak hücre dışına pompalanır. Mürekkep balığı aksonunda, bu nedenle, sitozoldeki K^+ konsantrasyonu çevre sıvıdan 20 kat kadar yüksekken, N^+ konsantrasyonu hücre dışı sıvıda hücre içindekinden yaklaşık 10 kat yüksektir.

İyonların elektrik yüklü olmaları nedeniyle, taşınmaları plazma zarının iki yanında bir elektrik gradiyentinin gelişimi ile sonuçlanır. Dinlenme halindeki bir mürekkep balığı aksonunda, hücre içi dışına göre negatif olmak üzere, plazma zarının iki yanında yaklaşık 60 mV değerinde bir elektrik potansiyeli

Bilgi İçin

Dev kalamarın akson çapı normal memeli aksonlarından yaklaşık 100 kat daha büyüktür. Geniş akson çapı kalamarın sinir uyarılarının çok hızlı iletimini sağlar ki bu düşmanlarından hızlı kaçabilmesi için yaşamsal önem taşımaktadır.



Şekil 14.19 Dev mürekkep balığı aksonunda iyon gradienti ve dinlenme zar potansiyeli Sinirsel uyarının iletiminde işlev gören iyonlar olduklarından sadece Na^+ ve K^+'un konsantrasyonları gösterilmiştir. K^+ hücre içine pompalanırken Na^+ hücre dışına pompalanır, böylece, aksonda Na^+ konsantrasyonu hücre dışında içindekine göre daha fazlayken, K^+ konsantrasyonu içeride dışarıdakinden fazladır. Dinlenme halindeki zar, açık K^+ kanalları içerdiği için, K^+'a diğer iyonlardan ve Na^+'dan daha geçirgendir. Bu nedenle, -60mV 'luk dinlenme halindeki zar potansiyeline en büyük katkıyı K^+ akışı yapar ve bu nedenle K^+'un denge potansiyeline yakındır.

vardır (Şekil 14.19). Bu elektrik potansiyeli hem iyon pompalarından hem de dinlenme halindeki hücrenin plazma zarında açık bulunan kanallardan iyon geçişinden kaynaklanır. Mürekkep balığının dinlenme halindeki bir aksonunun plazma zarı açık K^+ kanallarına sahiptir ve bu nedenle Na^+ ya da diğer iyonlardan daha fazla K^+ geçirir. Sonuçta, dinlenme halindeki zar potansiyeline en büyük katkıyı K^+ geçişi sağlar.

Bölüm 12'de tartışıldığı gibi, iyonların zardan geçişleri elektrokimyasal gradiyentin hem konsantrasyon hem de voltaj bileşenleri ile desteklenir. Örneğin, mürekkep balığı aksonunun içinde hücre dışı sıvıya kıyasla 20 kat fazla K^+ konsantrasyonu K^+'u hücre dışına çıkmaya sevk eder. Ancak, K^+ pozitif yüklü olduğundan, K^+'un hücreden çıkması, hücrenin içi negatif yüklü olacak şekilde, zarda bir elektrik potansiyeli oluşturur. Bu zar potansiyeli K^+ un hücre dışına süregelen akışına karşı çıkar ve sistem, K^+ konsantrasyon gradientinin zar potansiyeli ile dengelendiği bir denge durumuna ulaşır.

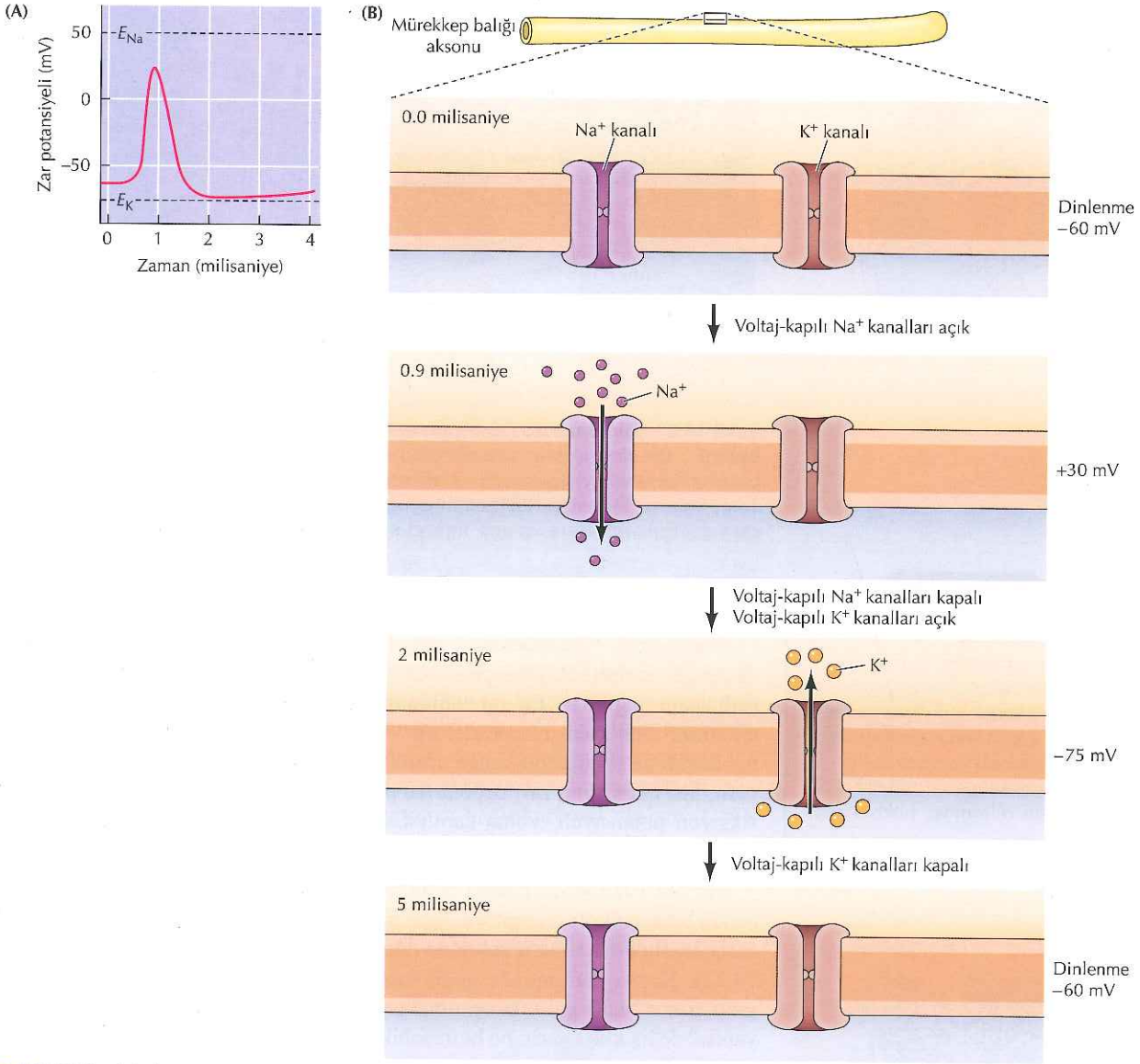
Kantitatif olarak, iyon konsantrasyonu ile zar potansiyeli arasındaki ilişki **Nemst eşitliği** ile verilir:

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}$$

Burada; V volt cinsinden denge potansiyeli, R gaz sabitesi, T mutlak sıcaklık, z iyonun yükü, F Faraday sabitesi ve C_0 ve C_i, sırasıyla, hücrenin dışındaki ve içindeki iyon konsantrasyonunu belirtir. Her iyon için ayrı bir denge potansiyeli vardır ve zar potansiyeli plazma zarından geçen tüm iyonların akışıyla belirlenir. Bununla beraber, mürekkep balığının dinlenme halindeki aksonları K^+'a, Na^+ ve diğer iyonlara (Cl^- dahil) olduğundan daha fazla geçirgen olduğu için dinlenme halindeki zar potansiyeli (-60 mV), hücre içi ve hücre dışı K^+ konsantrasyonunun belirlediği denge potansiyeline (-75 mV) yakındır.

Sinir uyarıları (**aksiyon potansiyelleri**) akson boyunca ilerledikçe, zar depolarize olur (Şekil 14.20). Zar potansiyeli milisaniyeden daha kısa sürede -60 mV'dan, yaklaşık +30 mV'a değişir, bundan sonra yeniden negatif olur ve dinlenme değerine geri döner. Bu değişimlerin nedeni, voltaj-kapılı Na^+ ve K^+ kanallarının hızla, sıralı açılıp kapanmalarıdır. Başlangıçtaki göreli küçük değişiklikler (-60 dan yaklaşık olarak -40 mV'a) Na^+ kanallarının hızlı, ancak kısa süreli açılmasına yol açar. Bu, Na^+'un, gerek konsantrasyon gradienti gerekse zar potansiyeli tarafından desteklenerek hücre içine akmasına olanak verir. Na^+'un ani girişi zar potansiyelinde büyük değişikliğe neden olur ve Na^+'un yaklaşık +50 mV'luk denge potansiyeline yaklaşarak, +30 mV'a yakın bir değere yükselir. Bu anda Na^+ kanalları inaktifleşir ve voltaj-kapılı K^+ kanalları açılarak, zarın K^+ geçirgenliği önemli düzeyde artar. Daha sonra K^+, hem zar potansiyeli hem de K^+ konsantrasyon gradientinin etkisiyle süratle hücre dışına akar ve böylece, zar potansiyelinde -75 mV'a kadar (K^+'un denge potansiyeli), hızlı bir düşüşe neden olur. Zar potansiyelindeki bu değişim voltaj-kapılı K^+ kanallarını inaktive eder ve zar potansiyeli, uyarılmamış hücrelerde açık kalan kanallardan K^+ ve diğer iyonların akışıyla belirlenen, dinlenme halindeki -60 mV düzeyine geri döner.

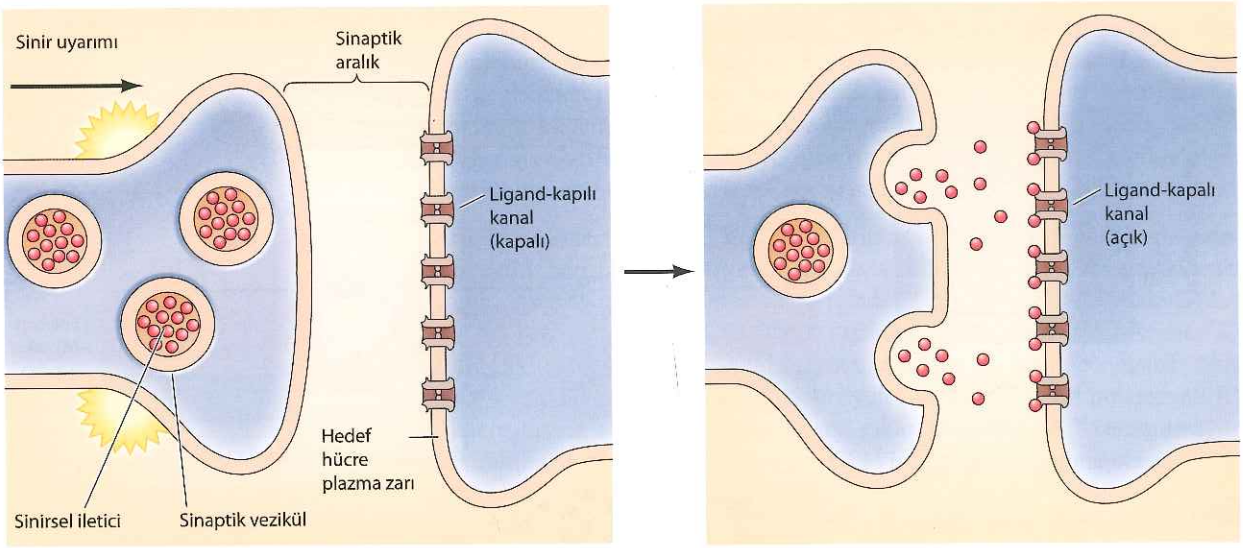
Plazma zarında bitişik bölgelerin depolarizasyonu, aksiyon potansiyellerinin sinir hücresi aksonları boyunca aşağı doğru hareket etmesini sağlar ve sonuçta, sinir uyarıları uzun mesafeler boyunca hızla



Şekil 14.20 Aksiyon potansiyeli sırasında zar potansiyeli ve iyon kanalları (A) Uyarımı takiben, bir dev mürekkep balığı aksonunun bir noktasındaki zar potansiyel değişiklikleri. E_{Na} ve E_K sırasıyla, Na^+ ve K^+'un denge potansiyelleridir. (B) Başlangıçta, voltaj-kapılı Na^+ kanalları açılınca zar potansiyeli yükselir. Daha sonra Na^+ kanalları inaktive olup, voltaj-kapılı K^+ kanalları açılınca zar potansiyeli dinlenme değerinin altına düşer. Voltaj-kapılı K^+ kanalları inaktive olunca da, zar potansiyeli dinlenme halindeki değerine geri döner.

iletilir. Örneğin, insan motor nöronlarının aksonları bir metreden daha uzun olabilir. Nöronların çoğunda aksiyon potansiyellerinin nöron ucuna ulaşması, sinaps bölgesinde hücreler arasında sinyal taşıyan, asetilkolin gibi sinirsel ileticilerin (nörotransmiter) salınmasını uyarır (Şekil 14.21).

Animasyon 14.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a14.1
Kimyasal Sinaps Sinir uyarısının nöronun ucuna (terminaline) ulaşması sinaptik vezikülün plazma zarı ile birleşmesini sağlar ve bu sayede nörotransmitter salınımı gerçekleşir.



Şekil 14.21 Bir sinapsta nörotransmiter (sinirsel iletici) salınımıyla sinyal iletimi Bir sinir uyarımının nöronun ucuna ulaşması, sinaptik veziküllerin plazma zarıyla kaynaşmasını ve nörotransmiterin presinaptik hücreden sinaptik aralığa serbestleşmesini uyarır. Sinirsel iletici, hedef hücrenin plazma zarındaki reseptörlere ve açık ligand-kapılı iyon kanallarına bağlanır.

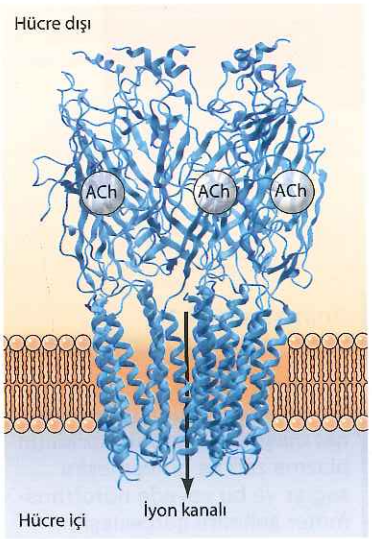
Bilgi İçin

Nikotinik asetilkolin reseptörleri nikotine yanıt verdiği için bu adı almıştır. Nikotin reseptörüne bağlanır ve kanal açık duruma geçer. Nikotinik asetilkolin reseptörlerinin aktivitesini bloklayan moleküller potent nörotoksinlerdir; bunlar birçok yılan zehrini ve bitkisel zehir içerir.

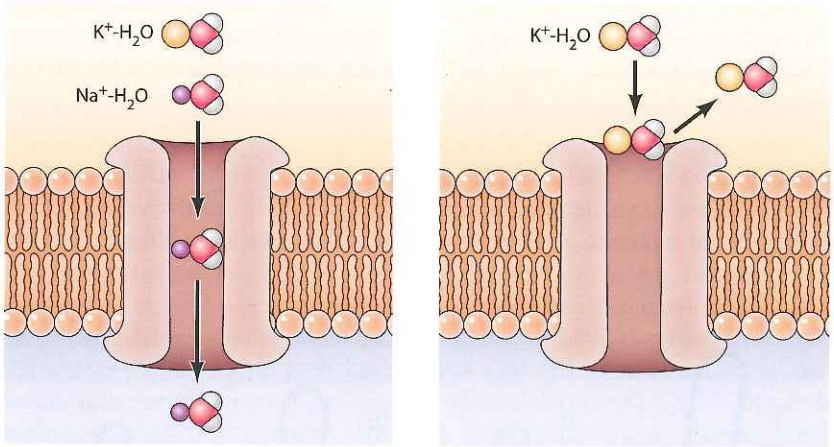
Presinaptik hücrelerden salgılanan nörotransmiterler postsinaptik hücrelerin zarlarındaki reseptörlere bağlanarak, ligand-kapılı iyon kanallarının açılmasını sağlarlar. En iyi tanımlanmış kanallardan biri, kas hücrelerinin nikotinik asetilkolin reseptörleridir. Asetilkolinin bağlanması, Na^+ ve K^+'un her ikisini de geçiren bir kanalı açar. Bu, Na^+'un süratle içeri akmasına olanak verir, kas hücresinin zarı depolarize olur ve bir aksiyon potansiyeli tetiklenir. Aksiyon potansiyeli, voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarını açılmasına ve kasılmayı uyaran hücre içi Ca^{2+} artışına neden olur (bkz. Şekil 13.28).

İlk kez 1970'lerde, çarpan balığın (*Torpedo ray*) elektrik organından izole edilen bu asetilkolin reseptörü, ligand-kapılı iyon kanalı prototipidir. Reseptör zar içerisinde bir silindir şeklinde düzenlenmiş beş alt birimden oluşur (**Şekil 14.22**). Kapalı durumunda geçiş kanalının, hidrofobik amino asitlerin yan gruplarınca bloke edildiği sanılmaktadır. Asetilkolinin bağlanması reseptörde yapısal değişiklik uyarır, bu hidrofobik yan zincirler kanaldan çekilir ve Na^+ ve K^+ dahil pozitif yüklü iyonların geçmesine olanak veren bir geçit açılır. Ancak, kanal negatif yüklü amino asitlerle kaplı olduğu için, Cl^- gibi negatif yüklü iyonları geçirmez.

Voltaj-kapılı Na^+ ve K^+ kanalları çok daha gelişmiş düzeyde bir seçicilik sergilerler. Na^+ kanalları, Na^+ için K^+'a göre on kattan daha fazla geçirgen



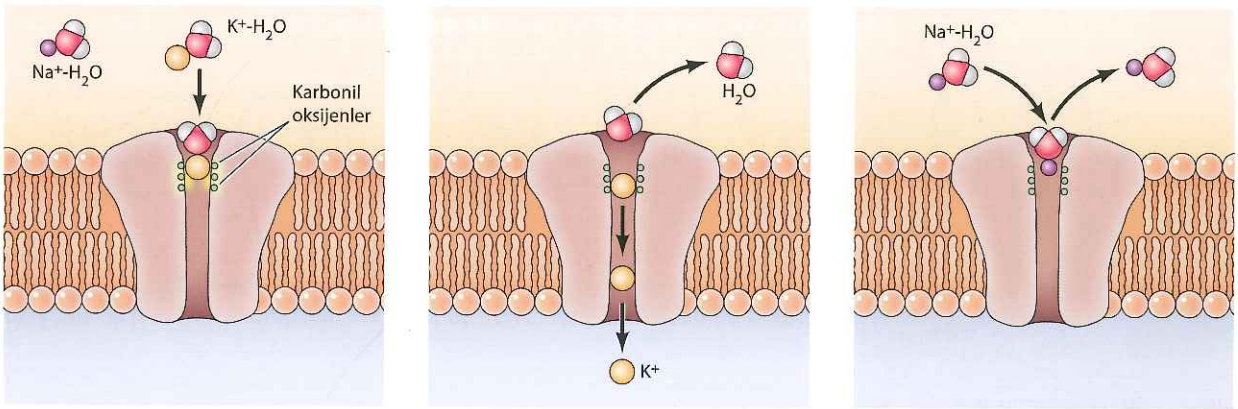
Şekil 14.22 Nikotinik asetilkolin reseptör modeli Memeli reseptörü merkezi bir por etrafında düzenlenmiş olan beş altbirime (her birinde dört transmembranal bölge olacak şekilde) sahiptir. Şekilde üç altbirim gösterilmiştir. Reseptörün hücre dışında kalan kısımlarına asetilkolinin bağlanması iyon kanal kapısını açan allosterik değişiklikleri başlatır (J.-P. Changeux and A. Taly, 2008, *Trends. Mol. Med.* 14: 93).



Şekil 14.23 Na^+ kanallarının iyon seçiciliği Dar geçit tek su molekülüne bağlı N^+'un geçişine izin verir ancak, K^+'un ya da daha büyük iyonların geçişini engeller.

iken, K^+ kanalları K^+ için Na^+'a göre bin kattan daha fazla geçirgendir. Na^+ kanallarının seçiciliği, büyüklük filtresi görevi yapan dar geçit dayanağıyla kısmen açıklanabilir. Na^+'un iyon çapı (0.95Å) K^+'unkinden (1.33Å) küçüktür ve Na^+ kanalı geçişinin K^+'un veya daha büyük iyonların geçişini engelleyecek kadar dar olduğu düşünülmektedir (Şekil 14.23).

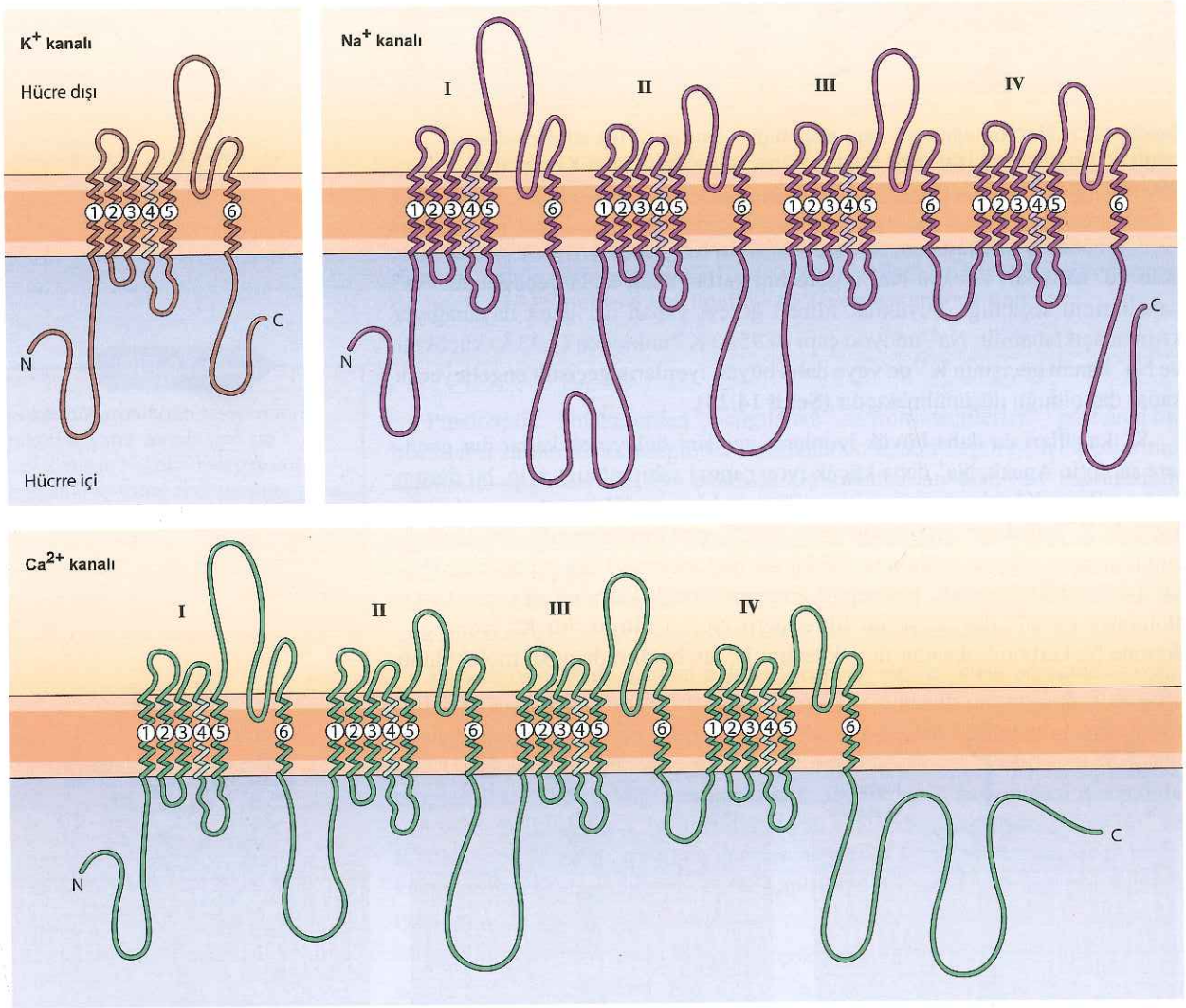
K^+ kanalları da daha büyük iyonların geçişini önleyecek kadar dar geçitlere sahiptir. Ancak, Na^+ daha küçük iyon çapına sahip olduğu için, bu durum bu kanalların K^+ için seçici geçirgenliğini açıklamaz. K^+ kanalının seçiciliği, 1998'de K^+ kanalının üç boyutlu yapısının X-ışını kristallografisi yöntemiyle tanımlanması sonucu aydınlanan farklı bir mekanizmaya dayanmaktadır (Şekil 14.24). Kanal geçidi, polipeptid omurgaya bağlı karbonil oksijen (C=O) atomlarıyla kaplı, dar bir seçici filtre içerir. Seçici filtreye bir K^+ iyonu girdiğinde bu karbonil oksijeni ile etkileşimi K^+'un bağlı olduğu su molekülünü



Şekil 14.24 K^+ kanallarının seçiciliği K^+ kanalı karbonil oksijeni ile kaplı, dar bir seçici filtre içerir. Geçit ancak, K^+ ile karbonil oksijeni arasındaki etkileşimler sonucu bağlı tüm su molekülleri uzaklaştırılmış olan susuz K^+'un geçmesine olanak verecek kadar geniştir. Na^+, seçici filtredeki karbonil oksijenleri ile etkileşemeyecek kadar küçüktür, bu nedenle, kanal geçidinden geçemeyecek kadar büyük bir komplekste, su moleküllerine bağlı olarak kalır.

uzaklaştırır ve susuz K^+'un pordan geçmesini sağlar. Bunun aksine, susuz bir Na^+, katı şekilde açık duran seçici filtredeki karbonil oksijeni ile etkileşmek için çok küçüktür. Sonuç olarak Na^+, kanaldan geçemeyecek kadar büyük sulu bir kompleksteki su moleküllerine bağlı kalır.

Voltaj-kapılı Na^+, K^+ ve Ca^{2+} kanallarının hepsi, büyük bir ilişkili proteinler ailesinin üyeleridir (**Şekil 14.25**). Örneğin, *C.elegans*'ın genom dizilimi, olasılıkla hücre sinyal iletiminde farklı roller oynaması gereken iyon kanallarını kodlayan 200 civarında geni ortaya çıkardı. K^+ kanalları, her biri iki ya da altı



Şekil 14.25 Voltaj geçişli katyon kanallarının yapıları (A) K^+, Na^+, Ca^{2+} kanalları birbirleriyle ilişkili proteinlerin yer aldığı bir aileye aittir. K^+ kanalı, şekilde bir tanesi gösterilen birbirinin aynısı dört altbirimin bir araya gelmesiyle oluşur. Na^+ kanalı, herbiri bir K kanalı altbirimine benzeyen dört tekrar bölgesinden oluşan tek bir polipeptid zincire sahiptir. Ca^+ kanalı, Na^+ kanalına benzerdir. Her altbirim ya da bölge altı α-sarmalına sahiptir. Beşinci ve altıncı sarmallar kanal porunu oluşturur. Dördüncü sarmal çok sayıda pozitif yüklü amino asite sahiptir ve zar potansiyeli üzerindeki değişikliklere yanıt olarak kanalın açılmasını sağlayan voltaj algılayıcısı olarak görev alır.

transmembran α sarmala sahip dört alt birimden oluşur. Na^+ ve Ca^{2+} kanalları tek bir polipeptid zincirinden oluşmuşlardır, ancak her polipeptid zinciri, K^+ kanal alt birimlerine benzeyen dört tekrar bölgesi içerir. Temel modül, 5. ve 6. sarmallar arasında iyon por bölgesi ve 1- 4. sarmallar arasında voltaj algılama modülü içerir. Dördüncü sarmal, pozitif yüklü çok sayıda amino aside sahiptir ve iyon porunu açarak membran potansiyelindeki değişimlere yanıt olarak hareket ettiği düşünülmektedir.

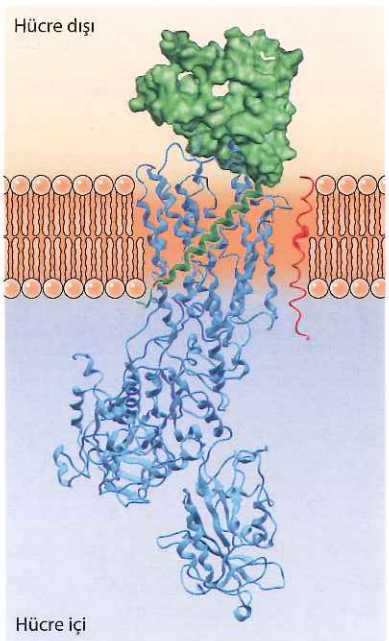
İyon kanallarının pek çok tipi (Ca^{2+} ve Cl^- kanalları dahil) farklı nörotransmiterlere yanıt verir veya zar depolarizasyonunu takiben farklı kinetiklerle açılıp kapanırlar. Birçok kanalın birlikte ve düzenli davranışları sinir sisteminde sinyal iletiminin karmaşıklığının nedenidir. Ayrıca, bir sonraki bölümde anlatıldığı gibi, iyon kanallarının rolü elektrikle uyarılabilen sinir ve kas hücreleriyle sınırlı değildir, diğer hücre tiplerinde de sinyal iletiminde oldukça önemli rol oynarlar. Böylece, iyon kanallarının düzenli açılıp kapanması, hücrelere çeşitli çevresel uyarılara yanıt verebilmesi için duyarlı ve çok yönlü mekanizmalar kazandırır.

ATP hidroliziyle desteklenen aktif taşıma

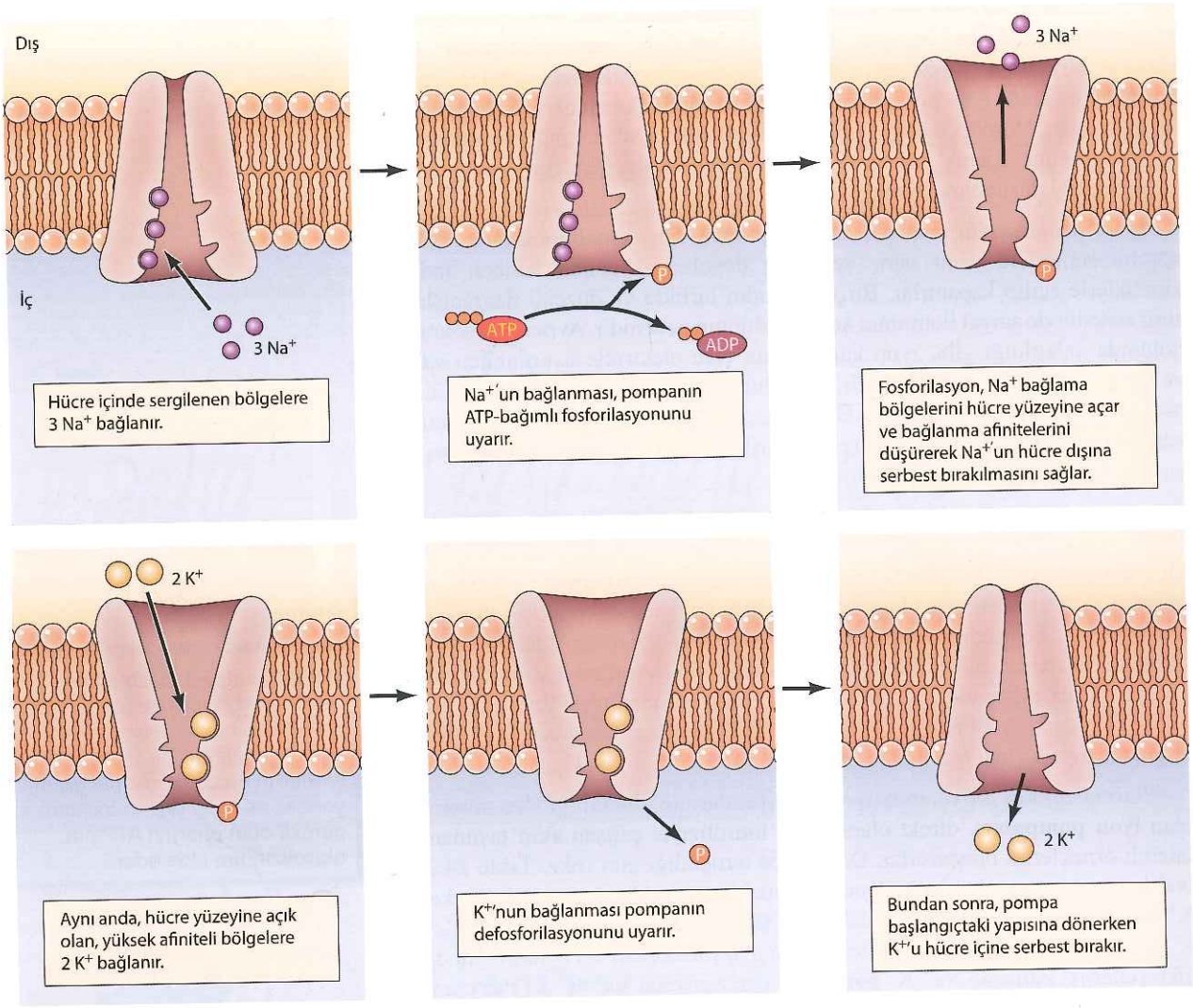
Moleküllerin kolaylaştırılmış difüzyonla, taşıyıcı proteinler veya kanal proteinleri üzerinden net akışı daima, zarın iki yanındaki elektrokimyasal gradiyentinin belirlediği, enerjetik olarak avantajlı yöndedir. Ancak, bir çok durumda hücrenin, molekülleri konsantrasyon gradiyentlerine karşı taşıması gerekir. **Aktif taşımada,** eşlenen diğer bir reaksiyondan (ATP hidrolizi gibi) elde edilen enerji, moleküllerin enerjetik olarak tercih edilmeyen yönde yukarı doğru taşınması amacıyla kullanılır.

Plazma zarının iki yanında iyon gradiyentlerinin sürekliliğinden sorumlu olan **iyon pompaları,** direkt olarak ATP hidroliziyle çalışan aktif taşımanın önemli örneklerini oluştururlar. Daha önce tartışıldığı gibi (bkz. Tablo 14.2), Na^+ konsantrasyonu hücrenin dışında içindekinden yaklaşık on kat fazlayken, K^+ konsantrasyonu içerde dışardakinden fazladır. Bu iyon gradienti, Na^+ ve K^+'u elektrokimyasal gradiyentlerine karşı taşımak için ATP hidrolizinden çıkan enerjiyi kullanan **Na^+-K^+ pompası** (aynı zamanda **Na^+-K^+ ATPaz** olarak da adlandırılır) tarafından korunur (**Şekil 14.26**). Bu olay, ATP tarafından pompada oluşturulan yapısal değişikliklerin sonucudur (**Şekil 14.27**). Önce, hücre içindeki yüksek-afiniteli bölgelere Na^+ iyonu bağlanır. Bu bağlanma, ATP'nin hidrolizine ve pompanın fosfatlanmasına yol açar ve böylece, Na^+ bağlayan bölgeleri hücre dışında sergileyecek yapısal değişiklikler uyarılır ve Na^+'a afinitesi azalır. Sonuç olarak, bağlı Na^+ hücre dışı sıvılara serbest bırakılır. Aynı anda, yüksek-afiniteli K^+ bağlayan bölgeler hücre dış yüzeyinde sergilenir. Bu bölgelere hücre dışındaki K^+'un bağlanması pompaya bağlı fosfatın ayrılmasını uyarır ve böylece, K^+-bağlayan bölgelerin sitoplazmaya dönmelerini ve bağlama afinitelerinin azalmasını sağlayan ikinci bir yapısal değişiklik gerçekleşir. Pompada, Na^+ için üç ve K^+ için iki bağlanma bölgesi

Animasyon 14.2
sites.sinauer.com/cooper7e/a14.2
Na^+-K^+ Pompası Plazma zarı üzerinde sodyum ve potasyum iyon gradiyentleri Na^+-K^+ pompası ile sağlanır. Bu pompa, iyonların elektrokimyasal gradiyentlerine karşı taşınması için gerekli olan enerjiyi ATP'nin hidrolizinden elde eder.



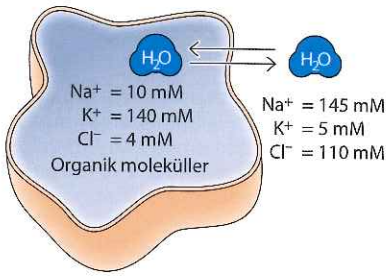
Şekil 14.26 Na^+-K^+ pompasının yapısı Na^+–K^+ pompası, 10 transmembranal α sarmal bölge (mavi) ve şekilsiz hücre dışı bölge (yeşil) içeren tek bir transmembran β altbirim bölgesinden oluşan bir heterodimerdir. Yapıyla ilişkili olan γ altbirimi (kırmızı) pompa görevini dokuya özgü şekilde regüle eder (J.P. Morth et al., 2007. *Nature* 450: 1043.)



Şekil 14.27 **Na^+-K^+ pompası çalışma modeli**

bulunduğundan, her döngüde bir ATP molekülü harcanarak, plazma zarından üç Na^+ ve iki K^+ taşınır.

Hayvan hücrelerinin bir çoğunda, kullanılan ATP'nin yaklaşık %25'ini tüketiyor olması, Na^+-K^+ pompasının öneminin bir göstergesidir. Pompanın sağladığı Na^+ ve K^+ gradiyentlerinin önemli rollerinden biri, sinir ve kasta elektrik sinyallerinin yayılımıdır. Az sonra tartışılacağı gibi, pompanın geliştirdiği Na^+ gradiyentinden, diğer çeşitli moleküllerin aktif taşınımı için de yararlanılır. Hayvan hücrelerinin çoğunda, Na^+-K^+ pompasının diğer bir önemli görevi de, ozmotik dengenin ve hücre hacminin korunmasıdır. Sitoplazma, makromoleküller, amino asitler, şekerler ve nükleotidler dahil olmak üzere yüksek konsantrasyonda organik molekül içerir. Karşıt dengeleyen olmaması halinde bu durum, ozmozla içeri doğru su akışına



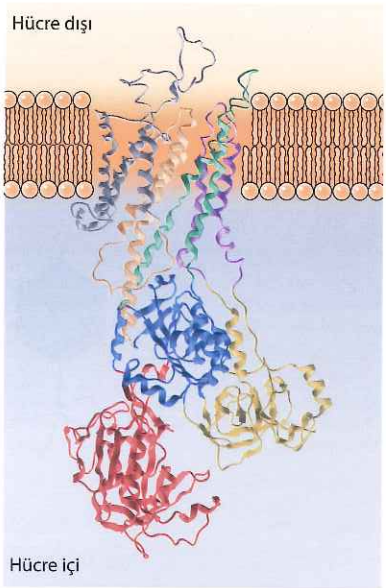
Şekil 14.28 Tipik bir memeli hücresinde plazma zarının iki yanındaki iyon gradientleri Na^+ ve Cl^- konsantrasyonları hücre dışında içindekinden fazla iken, K^+ içerde dışardakinden yüksektir. Na^+ ve Cl^-'un hücre içindeki düşük konsantrasyonu organik moleküllerin yüksek konsantrasyonunu dengeler, ozmotik basıncı eşitleyerek suyun içeri doğru net girişini engeller.

neden olur ve kontrol edilmediği taktirde hücrenin şişmesi ve sonunda patlamasıyla sonuçlanır. Gerekli karşıt denge, Na^+-K^+ pompasının oluşturduğu iyon gradiyentleri ile sağlanır (Şekil 14.28). Özellikle, pompa hücre dışında içindekinden daha yüksek Na^+ konsantrasyonu oluşturur. Daha önce anlatıldığı gibi, daha sonra K^+'un açık kanallardan geçişi plazma zarının iki yanında elektrik potansiyeli oluşturur. Bu zar potansiyeli de, Cl^-'un hücre dışına çıkmasına neden olur, sonuçta hücre dışındaki Cl^- iyon konsantrasyonu (Na^+'unki gibi) hücre dışı sıvılarda sitoplazmadakinden on kat daha yüksektir. İyon konsantrasyonlarındaki bu farklılık, ozmotik basıncı eşitleyerek ve suyun içeri doğru hareketini önleyerek, hücre içindeki organik moleküllerin yüksek konsantrasyonunu dengeler.

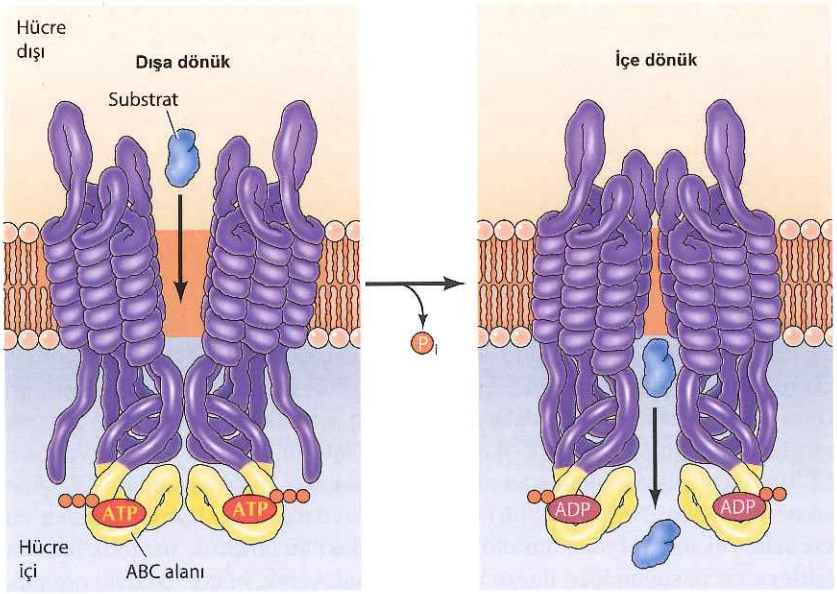
Ca^{2+}'un plazma zarından aktif taşımını, yapısal olarak Na^+-K^+ pompasını andıran ve benzer şekilde ATP hidroliziyle çalışan bir Ca^{2+} pompasıyla sağlanır (Şekil 14.29). Ca^{2+} pompası Ca^{2+}'u hücre dışına taşır, bu nedenle hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu oldukça düşüktür: 1 mM civarındaki hücre dışı konsantrasyonuna karşın, yaklaşık 0.1 mM'dır. Ca^{2+}'un hücre içindeki bu düşük konsantrasyonu hücreyi, hücre içi Ca^{2+} düzeyindeki çok küçük artışlara duyarlı kılar. Hücre içi Ca^{2+} düzeyindeki bu kısa süreli ve belli yerlerle sınırlı olan artışlar, daha önce kas kasılması konusuyla ilgili olarak belirtildiği (bkz. Şekil 13.28) ve 16. Bölümde tartışılacağı gibi, hücre sinyal iletiminde önemli roller oynar.

Bakteri, maya ve bitki hücrelerinin plazma zarlarındaki benzer iyon pompaları H^+'un hücre dışına aktif taşınmasından sorumludur. Ayrıca, mide içini kaplayan hücrelerden de H^+ aktif olarak dışarı pompalanır ki bu, gastrik sıvının asiditesinin nedenidir. Lizozom ve endozomların içerisine H^+'un taşınmasından farklı yapıdaki pompalar sorumludur (bkz. Şekil 11.39). Üçüncü bir H^+ pompa tipi örneği de, kloroplast ve mitokondrilerdeki ATP sentezleridir. Bu pompalar, iyonların elektrokimyasal gradiyent yönünde hareketinin ATP sentezini desteklemek için kullanıldığı, ters yönde çalışan pompalardır.

En geniş membran taşıyıcısı ailesi, iyi korunmuş "ATP- bağlama bölgeleri ya da ATP-bağlama kasetleri"leri ile tanımlanan **ABC taşıyıcılarıdır** (Şekil 14.30). Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde 100'den fazla üyesi tanımlanmıştır. *E. Coli*'de 79 ve insanlarda 48 adet bilinen ABC taşıyıcısı geni vardır. Bu ailenin farklı üyeleri, besinleri hücre içine alan importörler (prokaryotlarda) ya da zehirli maddeleri hücre dışına pompalayan eksportörler



Şekil 14.29 Ca^{2+} pompası yapısı Ca^{2+} pompasının sitozolik alt üniteleri kırmızı, mavi ve sarı olarak; transmembran alt üniteleri ise ten rengi, yeşil ve mor olarak görülmektedir. (From C. Olesen et al., 2007. *Nature* 450: 1037.)



Şekil 14.30 ABC transportörü aracılı aktif taşıma modeli Transportörler iki transmembran (her biri membranı çevreleyen altı α sarmalı içeren) ve iki sitozolik ATP-bağlanma (ABC bölgeleri) bölgelerinden oluşur. Şekilde tasvir edilen substrat bağlama bölgesi dışarı doğru ve ABC bölgesine ATP bağlı olan birim portördür. Transportör, ATP'nin ADP'ye hidrolizi ile konformasyonunu değiştirir ve substratı hücre içerisine bırakır.

(prokaryot ve ökaryotlarda) olarak görev görür. ABC transportörleri 2 ATP bağlama ve iki transmembran bölgesine sahiptir. Substrat bağlama bölgeleri, ATP bağlama ve hidrolize olma durumlarına bağlı olarak dışarı ya da içeri doğru yönelik olarak farklı konumlarda bulunabilir. Bu nedenle bir importörde, ATP-bağlı transportör dışarı yöneliktir ve substratına hücrenin dışında bağlanır. ATP'nin ADP'ye hidrolizi transportörün konformasyonunu değiştirip içeri doğru yönelmesini sağlar ve substratını sitoplazmaya bırakır. Transportör böylece hücrenin içeriğini kontrol etmek amacıyla ATP şeklinde depolanan serbest enerjiyi kullanır.

İlk ökaryotik ABC taşıyıcısı, kanser hücrelerini kemoterapide kullanılan birçok ilaca karşı dirençli hale getiren bir gen ürünü ("çoklu direnç" geni ya da *mdr* geni) olarak keşfedilmiştir. Günümüzde iki MDR taşıyıcı tanımlanmıştır. Normal koşullarda, potansiyel olarak zehirli olan yabancı maddeleri uzaklaştırmak üzere çeşitli hücrelerde ifade edilirler. Örneğin, beynin kılcal endotelyal hücrelerinde ifade edilen bir MDR taşıyıcısının beyni zehirli kimyasallara karşı korumada önemli bir rol oynadığı gözlenmiştir. MDR taşıyıcıları, çeşitli ilaçları tanıyıp hücre dışına pompaladıkları kanser hücrelerinde maalesef sıklıkla yüksek seviyelerde ifade edilirler. Bu durum, kanser hücrelerini çok geniş bir spektrumdaki kemoterapötik ajanlara karşı dirençli kılar ve başarılı kanser tedavisi için ciddi engel yaratır.

ABC taşıyıcılar ailesinin tıbbi açıdan önemli diğer bir üyesi de kistik fibrozisden sorumlu olan gendir. Bu genin ürünü (kistik fibrozis transmembran iletim düzenleyici = *cystic fibrosis conductance regülatör*, ya da CFTR olarak adlandırılır) ABC ailesi üyesi olmasına karşın epitel

Moleküler Tıp

Kistik Fibrozis

Hastalık

Kistik fibrozis, çocukları ve genç erişkinleri etkileyen çekinik bir genetik hastalıktır. Diğer ırklarda nadir olmakla birlikte, 2500 yenidoğandan birinin etkilendiği beyaz ırkta en sık kalıtılan ölümcül hastalıktır. Kistik fibrozisin karakteristik özelliği, solunum ve sindirim kanallarını kaplayan hücreler dahil bir çok epitel hücre çeşidinin anormal derecede yoğun ve yapışkan bir mukus üretmeleridir. Ilk klinik belirtisi, akciğer hava yollarının kalın bir mukus tıkacıyla tıkanması ve bunu izleyen, tekrarlayan bakteri enfeksiyonları sonucunda ortaya çıkan bir solunum rahatsızlığıdır. Pankreas kanallarının tıkanması nedeniyle bir çok hastada pankreas da işe karışır. Ter bezlerinin çalışması da anormaldir ve terdeki aşırı tuz kistik fibrozisi tanımlar.

Hastalığa şu anki yaklaşım, bronşların boşalmasını kolaylaştıran fizik tedaviyi, antibiyotik kullanımını ve pankreas enzim replasmanını kapsar. Bu uygulamalar her ne kadar hastanın yaşamını 30 yaşına kadar uzatıyorsa da, sonuçta kistik fibrozis öldürücüdür ve ölümlerin %95'inden akciğer hastalığı sorumludur.

Moleküler ve Hücresel Temel

Kistik fibrozisin belirtisi, ter kanallarının ve solunum sisteminin iç yüzeyini kaplayanlar da dahil etkilenmiş epitel dokulardaki Cl^- taşınım bozukluğudur. Kistik fibrozis hastalarının epitel hücrelerindeki Cl^- kanallarının normal çalışamadıkları 1984'de gösterildi. Hastalığın moleküler temeli, kistik fibrozis geninin 1989'da bir moleküler klon olarak izole edilmesiyle aydınlatıldı. Genin dizi analizi, ABC taşıyıcı ailesinden bir proteini (kistik fibrozis transmembran iletim düzenleyici= *cystic fibrosis transmembrane conductance regülatör*, CFTR olarak adlandırıldı) kodladığını gösteriyordu. Sonraki çeşitli araştırmalar, CFTR'nin Cl^- kanalı olarak işlev gördüğünü ve kistik fibrozisden sorumlu mutasyonun direkt olarak hatalı Cl^- taşınımına sebep olduğunu gösterdi. Kistik fibrozis olgularının yaklaşık %70'i CFTR proteinin katlanmasını bozan tek bir mutasyonun (508. fenilalaninin delesyonu) sonucudur.

Önlem ve Tedavi

Diğer kalıtılan hastalıklarda da olduğu gibi, kistik fibrozis geninin izolasyonu, mutant allel taşıyan bireylerin belirlenmesi için genetik tarama olasılığını gündeme getirdi. Bazı toplumlarda mutant genlerin heterozigot taşıyıcı sıklığının 25 bireyde bir gibi yüksek olması, riskli çiftlerin belirlenmesi ve genetik danışma sağlanması için genel toplum taramasının gereğine işaret eder. Ayrıca, bir Cl^- kanalı olarak CFTR'nin işlevinin anlaşılması tedavi için gen terapisi, mutant CFTR proteinlerinin işlenmesini değiştirebilecek ya da mutant reseptörler ile Cl^- taşınmasını artıracak ilaçların kullanımı gibi yeni yaklaşımları önermektedir.

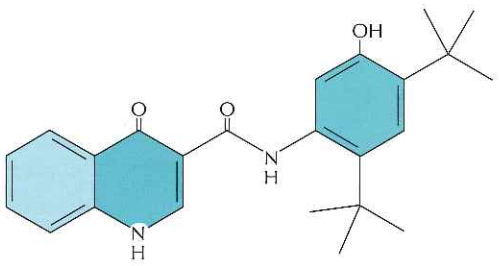
Olasılıklardan biri, etkilenen epitellerdeki diğer Cl^- kanallarını açacak ilaçların kullanımıdır. Kistik fibrozis hastalarının kültürdeki hücrelerine normal CFTR geninin verilmesiyle Cl^- kanal fonksiyonlarının yerine geldiğini gösteren araştırmalar gen tedavisinin etkinliğini desteklemektedir. Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar, viral vektörlerin CFTR cDNA' sını solunum epiteline aktarabildiklerini göstermiş ve kistik fibrozis için gen tedavisinin insanda ilk denemesi 1993'de başlatılmıştır. Bugüne kadar yapılan denemeler, CFTR'nin kistik fibrozisli hastaların bronş epitel hücrelerine, güvenli bir şekilde, aktarılabildiğini ve eksprese olduğunu göstermiştir. Ancak gen aktarımının etkinliği klinikte yarar sağlayabilmek adına çok düşüktür.

Bunun aksine, kistik fibrozis tedavisinde küçük moleküllerin geliştirilmesi heyecan verici bir gelişme olmuştur. Kistik fibrozise karşı etkin ilk ilaç (ivacaftor) belirli CFTR mutantlarını hedefleyen küçük moleküllerin taranması sonucunda 2009 yılında tanımlanmıştır. Ivacaftor, 551. pozisyonda glisin varyantı (G551D) yerine aspartik asit içeren mutant CFTR'ye karşı etkindir. Kistik fibrosis olgularının yaklaşık %5'ini oluşturan G551D CFTR, plazma zarına normal şekilde taşınır fakat Cl^- taşınmasında yetersizdir. Ivacaftor, mutant G551D CFTR ile Cl^- taşınmasını hastaların yarar görebileceği bir seviyeye kadar arttırır. Bu ilaç ayrıca, birkaç diğer mutant CFTR'ye karşı da aktiftir ve 2012 yılında FDA tarafından klinik kulllanım için onaylanmıştır. Daha ileri çalışmalar, yaygın olan CFTR fenilalanin 508 delesyonununun katlanmasını hızlandıran bir ilacı (lumacaftor) tanımlamıştır. Lumacaftor, CFTR'deki bu yaygın olan bozukluğa sahip hastaların tedavisi için Temmuz 2015'te FDA onayı almıştır.

Kaynaklar

Armstrong, D. K., S. Cunningham, J. C. Davies and E. W. F. W. Alton. 2014. Gene therapy in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* 99: 465-468.

Cutting, G. R. 2015. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature Rev. Genet.* 16: 45-56



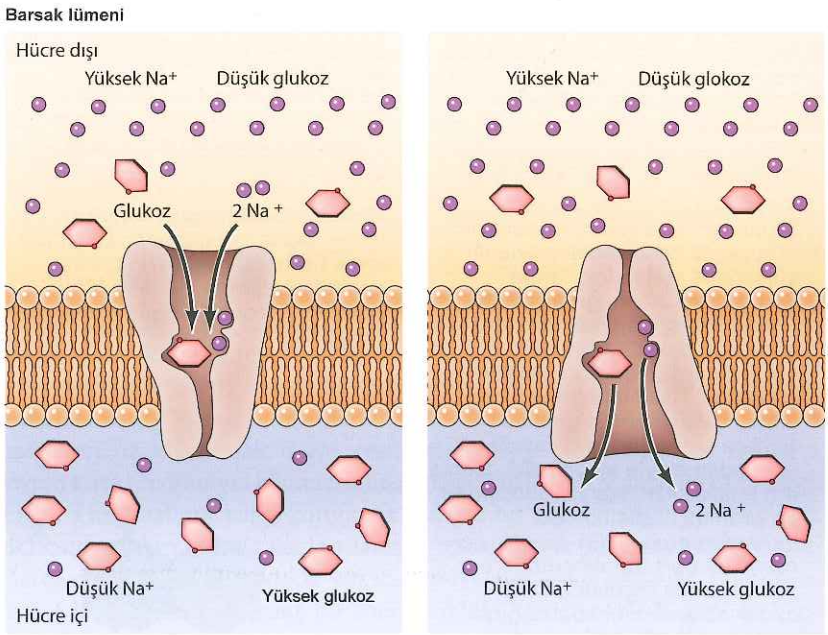
Ivacaftor'un yapısı, kistik fibrosis için ilk küçük molekül ilaç.

hücrelerinde Cl^- kanalı olarak çalışır ve hatalı Cl^- taşınımı bu hastalığın özelliğidir. CFTR Cl^- kanalı, açılmak için hem ATP hidrolizi hem de cAMP-bağımlı fosforillenme gereksinimi ile de olağan dışıdır. CFTR'nin denetlenen bir iyon kanalı olarak çalışmasının altında yatan yapısal özelliği ileriki araştırmalarla çözümlenecektir. Birçok kistik fibrozis olgusu, CFTR'nin düzgün katlanmasını etkileyen tek bir nokta mutasyonunun sonucudur.

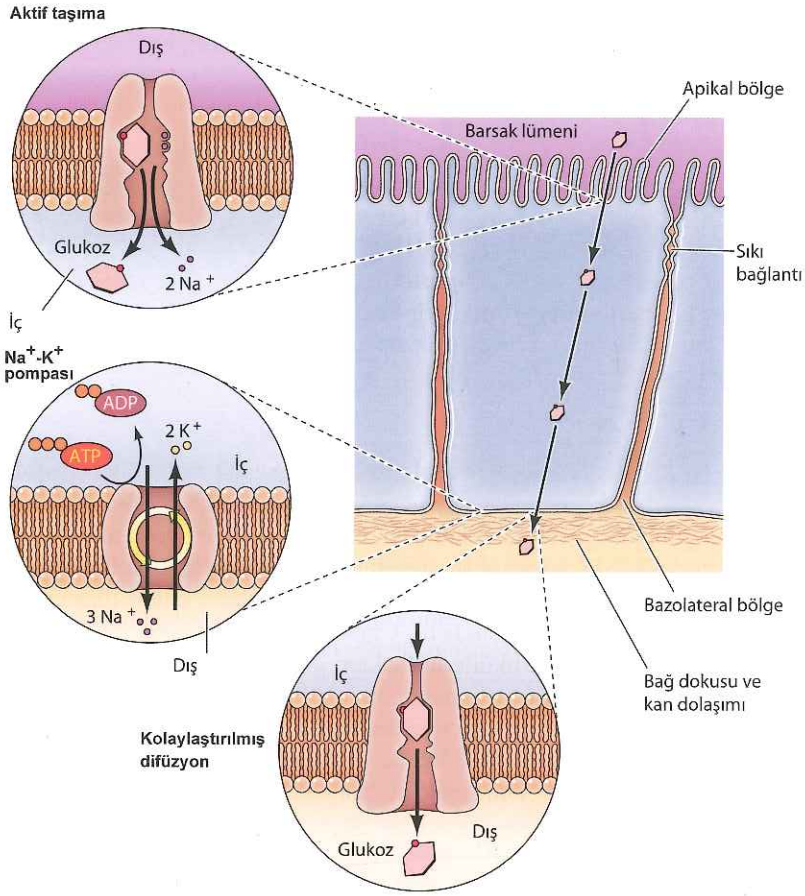
İyon değişim derecesi (ion gradient) ile yürütülen aktif taşıma

Bir önceki kısımda tartışılan iyon pompaları ve ABC taşıyıcılar, molekülleri elektrokimyasal gradiyentlerine aykırı yönde taşımak için, direkt olarak ATP hidrolizinden çıkan enerjiyi kullanırlar. Diğer moleküller konsantrasyon gradiyentlerine aykırı olarak, ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi değil, ikinci bir molekülün enerjetik olarak olumlu yönde, eşlikli taşınmasından elde edilen enerjiyi kullanarak taşınırlar. Na^+- K^+ pompası ile oluşturulan Na^+ gradiyenti, memeli hücrelerinde; şekerlerin, amino asitlerin ve iyonların aktif taşımının besleyen bir enerji kaynağı sağlar. Bakteri, maya ve bitki hücrelerindeki H^+ pompalarının oluşturduğu H^+ gradiyenti de benzer rol oynar.

Barsak iç yüzeyini kaplayan epitel hücreleri, Na^+ gradiyenti ile yürütülen aktif taşımaya iyi bir örnek oluşturur. Bu hücreler, besinlerdeki şeker ve amino asitleri barsak lümeninden almak için, plazma zarlarının apikal kısımlarındaki aktif-taşımadan yararlanırlar. Örneğin, glukoz alımı, iki Na^+ ile bir glukozu koordine şekilde hücre içine taşıyan bir taşıyıcı tarafından gerçekleştirilir (**Şekil 14.31**). Na^+'un elektrokimyasal gradiyente uygun akışı, besin glukozunun



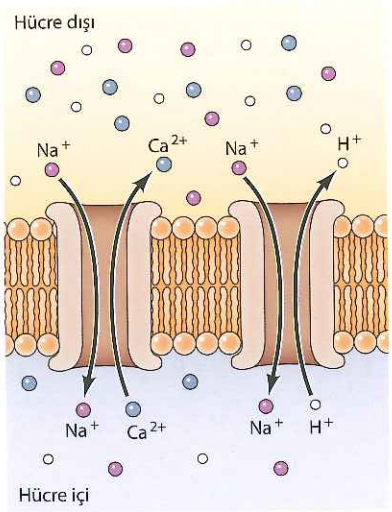
Şekil 14.31 Glukozun aktif taşınımı Glukozun barsak lümeninden alınmasından, Na^+ gradientiyle desteklenen aktif taşıma sorumludur. Taşıyıcı, iki Na^+ iyonları ve bir glukozu eşgüdümlü olarak bağlar ve hücre içine taşır. Na^+'un enerjetik olarak uygun yönde taşınımı, glukozun konsantrasyon gradientine karşı alınımını destekler.



Şekil 14.32 Barsak epitel hücrelerinde glukoz taşınımı Plazma zarının apikal kısmındaki bir taşıyıcı, glukozun barsak lümeninden aktif olarak alınmasından (şekil 14.31'de Na^+ ile birlikte gösterildiği gibi) sorumludur. Sonuç olarak besin glukozu emilir ve barsak epitel hücreleri içinde biriktirilir. Glukoz daha sonra, plazma zarının bazolateral kısmındaki bir taşıyıcı tarafından kolaylaştırılmış difüzyonla, bu hücrelerden alttaki bağ dokusuna ve kan dolaşımına aktarılır. Sistem, yine bazolateral kısımda bulunan Na^+-K^+ pompası ile desteklenir.

alınması ve hücre içerisinde yüksek glukoz konsantrasyonunun birikimi için gerekli enerjiyi sağlar. Daha sonra glukoz, barsak epitelinin bazolateral yüzeyinden alttaki bağ dokusuna (kan kapilerleri içerir), konsantrasyon gradiyentine uygun yönde, kolaylaştırılmış difüzyonla bırakılır (Şekil 14.32). Glukozun barsak lümeninden alımı ve dolaşıma bırakılması epitel hücrelerinin, aktif taşıma ve kolaylaştırılmış difüzyon taşıyıcılarının özellikle plazma zarının, sırasıyla, apikal ve bazolateral kısımlarına yerleşmesinden kaynaklanan, polarize fonksiyonuna güzel bir örnektir.

Glukoz ile Na^+'un eşgüdümlü alımı, iki molekülün aynı yönde taşınması anlamına gelen **simport**'a örnektir. Bunun aksine, glukozun kolaylaştırılmış difüzyonu **uniport** yani tek molekülün taşınmasına örnektir. Aktif taşıma,



Şekil 14.33 Antiport örnekleri Ca^{2+} ile H^+'un hücreden çıkışları, bunu, Na^+'un enerjetik olarak desteklenen hücre içine girişiyle eşgüdümleyen antiportörler tarafından sağlanır.

iki molekülün zıt yönlere taşınması, yani **antiport** şeklinde de görülür (Şekil 14.33). Örneğin, Ca^{2+} hücreden, sadece Ca^{2+} pompasıyla değil, ayrıca Na^+'u hücre içine alırken Ca^{2+}'u dışarı taşıyan bir Na^+-Ca^{2+} antiporteri ile de çıkartılır. Diğer bir örnek, hücre içi pH'nın kontrolüyle görevli olan Na^+-H^+ değiş tokuş proteinidir. Na^+-H^+ antiportörler, Na^+'un hücre içine alınımı H^+'un hücre dışına gönderilmesiyle birleştirir ve böylece, metabolik reaksiyonlarla oluşan H^+'nun fazlasını uzaklaştırarak sitoplazmanın asitleşmesini önler.

Endositoz

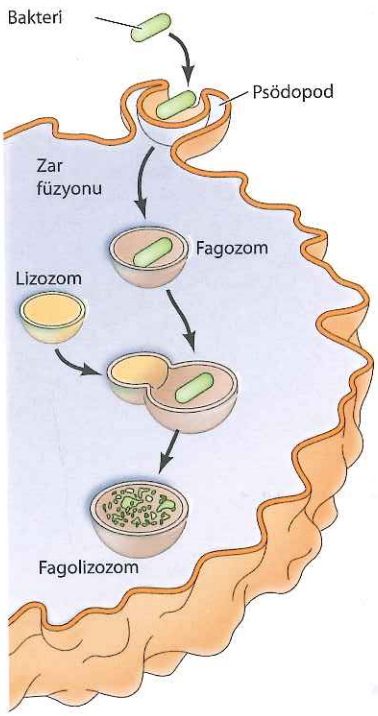
Daha önce bahsedilen taşıyıcı ve kanal proteinleri, küçük molekülleri fosfolipid çift tabakadan geçirirler. Ökaryot hücreler aynı zamanda, **endositoz** denilen farklı bir yöntemle, çevresel ortamdaki makromolekülleri ve partikülleri de alabilirler. Endositozda, içeri alınacak olan madde plazma zarının bir bölümü tarafından kuşatılır ve zar, alınan maddeyi kapsayan bir vezikül oluşturmak üzere hücre içine doğru tomurcuklanır. Christian de Duve 1963'de "Endositoz" terimini, hem büyük partiküllerin (bakteri gibi) yutulması hem de, küçük veziküller içerisinde sıvıların veya makromoleküllerin alınması için, ikisini de kapsamak üzere kullanmıştır. Bu aktivitelerden ilki **fagositoz** (hücrenin yemesi) olarak bilinmektedir ve büyük ölçüde özelleşmiş hücre tiplerinde ortaya çıkar. Bütün ökaryotik hücrelerde endositozun diğer formları birkaç farklı mekanizma üzerinden gerçekleşir.

Animasyon 14.3
sites.sinauer.com/cooper7e/a14.3
Endositoz Endositozda, hücre dışı maddelerin içeri alınması için plazma zarı küçük veziküller ya da büyük veziküller (fagositoz) oluşturur.

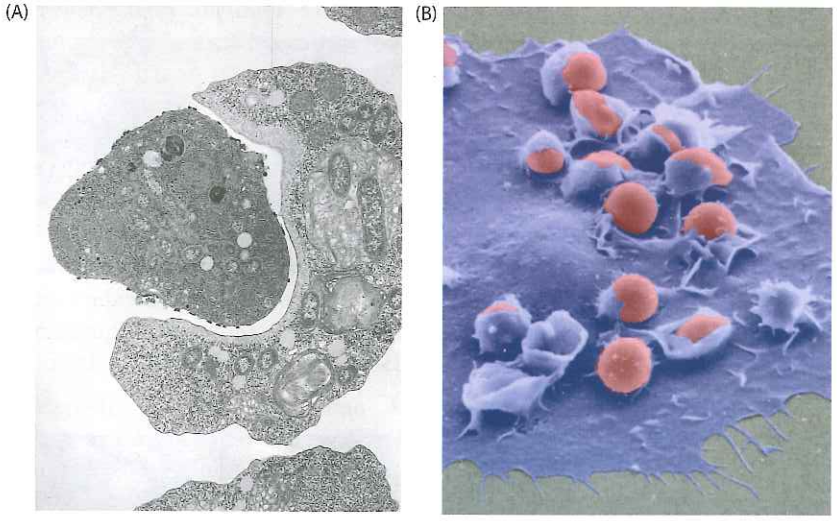
Fagositoz

Fagositoz sürecinde hücre; bakteriler, hücre kalıntıları veya hatta bütün bir hücre gibi büyük partikülleri içine alır (Şekil 14.34). Fagositik hücrenin yüzeyindeki reseptöre partikülün bağlanması, Bölüm 13'de ele alınan ve hücre yüzeyinin aktine-dayalı hareketlerinden biri olan, psödopod (yalancı ayak) oluşumunu tetikler. Bunun sonucunda, psödopod, partikülü kuşatır ve **fagozom** olarak adlandırılan büyük bir hücre içi vezikül (>0.5 μm çapında) oluşturmak üzere zarları birleşir. Fagozomlar daha sonra lizozomlarla birleşerek **fagolizozomları** oluştururlar ki, içerisinde kalan partikül asit hidrolazların etkisiyle sindirilir (bkz. Bölüm 11).

Büyük partiküllerin fagositozla hücre içine alınması farklı tip hücrelerde farklı roller oynar (Şekil 14.35). Amiblerin çoğu fagositozu, bakteri ya da diğer protozoalar gibi besin partiküllerini yakalamak için kullanır. Çok hücreli hayvanlarda fagositozun en önemli rolü, istila eden mikroorganizmalara karşı savunma veya yaşlı ya da hasarlı hücrelerin vücuttan uzaklaştırılmasıdır. Memelilerde mikroorganizmaların fagositozu sıklıkla "profesyonel fagositler" olarak adlandırılan üç çeşit beyaz kan hücresinin, makrofaj, nötrofil ve



Şekil 14.34 Fagositoz Bakterinin, hücre yüzeyine bağlanması, sonunda bakteriyi saracak olan bir psödopodun gelişimini uyarır. Psödopod zarlarının birbirine kaynaşması sonucunda büyük bir hücre içi vezikül (fagozom) oluşur. Fagozom lizozomlarla birleşerek içerisinde yutulan bakterinin sindirileceği bir fagolizozom oluşturur.



Şekil 14.35 Fagositik hücrelere örnekler (A) Bir başka protisti yutan amipe ait elektron mikroskop görüntüsü. (B) Kırmızı kan hücrelerini sindiren makrofaja ait tarayıcı elektron mikroskop görüntüsü. Mikrografa yapay renkler eklenmiştir. (B, Joel Swanson'ın izni ile, Michigan Üniversitesi).

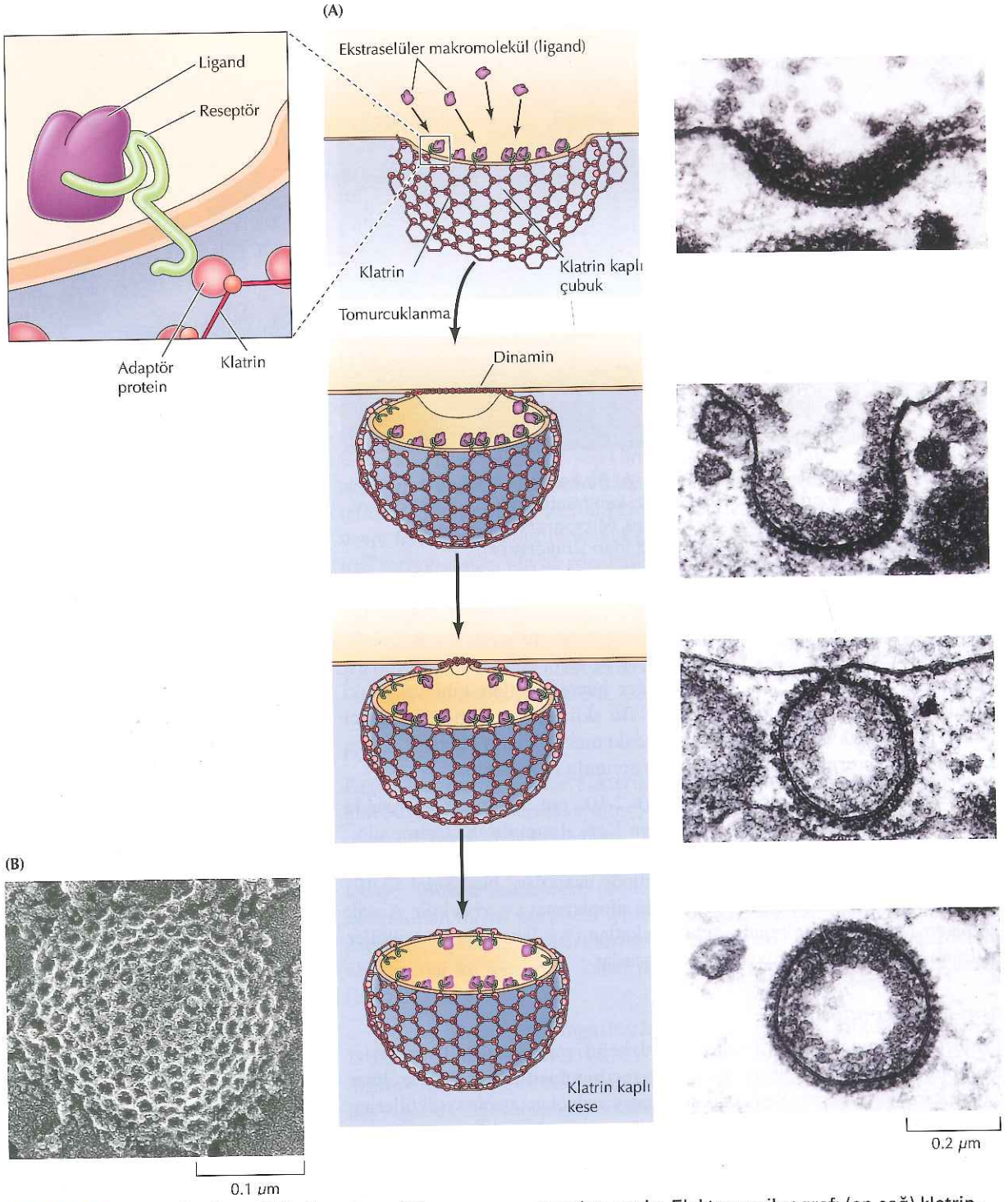
dentritik hücrelerin bir fonksiyonudur. Bu hücreler, enfekte dokulardan mikroorganizmaları uzaklaştırarak, vücudun savunma sisteminde çok önemli rol oynarlar. Makrofajlar, ayrıca Bölüm 18'de de tartışıldığı üzere, fibroblast ve epitel hücrelerinin de dahil olduğu diğer hücre çeşitleri gibi vücuttaki dokulardan yaşlı ve ölü hücreleri temizler. Bu aktivite konusunda etkileyici bir örnek, insan dalak ve karaciğer dokusundaki makrofajların günde 10^{11}'den fazla yaşlı kan hücresinin yok edilmesinden sorumlu olmalarıdır.

Makropinositoz, büyük veziküller (0.2-10 μm çapında) içerisinde bulunan partikül yerine hücre dışı sıvılarının içeri alınımıdır. Fagositoz gibi, makropinositoz da plazma zarının aktine dayalı hareketinin bir sonucudur ve lamellipodia (plazma zarının tabaka şeklinde uzantıları, bkz. Şekil 13.19) oluşumuna yol açar. Lamellipodia genellikle sitoplazmaya geri çekilir. Ancak bazen plazma zarında açık kupalar şeklinde katlanır ve daha büyük veziküller oluşturmak üzere membran füzyonuna yol açarlar.

Klatrin-aracılı endositoz

Endositozun üzerinde en çok çalışılmış çeşidi belirli makromoleküllerin seçici alınımı için bir mekanizma oluşturan **klatrin-aracılı endositoz**'dur. Ekstraselüler materyal, kargoyu endozom ve lizozomlara taşıyacak olan taşıma veziküllerine alınır. Endositozda gözlenen kargonun seçilmesi, vezikül tomurcuklanması ve vezikül füzyonuna ait mekanizmalar, 11. bölümde tartışılan sekretuvar yolaktaki vezikülle taşıma mekanizmalarına benzerdir. Hücre içerisine alınacak olan makromoleküller önce plazma zarı üzerinde bulunan sınırlı bir alan üzerinden özgül hücre yüzey reseptörlerine bağlanır. Bu reseptörlerin çoğu, plazma zarının **klatrin-kaplı çukurcuklar** olarak tanımlanan belirli bölgelerinde konsantre olmuşlardır (Şekil 14.36). Bu reseptörler üzerinde bulunan içeri alınım sinyalleri sitozolik adaptör proteinlerine bağlanır. Bu proteinler de *trans* - Golgi ağından vezikül tomurcuklanmasına benzer şekilde zarın sitozolik kısmında bulunan klatrinlere bağlanır (bkz. Şekil 11.36).

Video 14.3
sites.sinauer.com/cooper7e/v14.3
Klatrin-Aracılı Endositoz
Klatrin-kaplı çukurcuk önce zar yüzeyinde oluşur, daha sonra vezikül oluşturmak üzere tomurcuklanarak hücrenin içine doğru ayrılır.



Şekil 14.36 Klatrin-kaplı vezikül oluşumu (A) Ekstraselüler moleküller (ligandlar) klatrin-kaplı çukurcuklar içerisinde yoğun olarak bulunan hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanır. Adaptör proteinler, hem klatrine hem de reseptörün sitoplazmik kuyruklarındaki internalizasyon sinyallerine bağlanır. GTP-bağlayan bir protein olan dinaminin yardımı ile bu çukurcuklar hücre içi klatrin kaplı veziküller oluşturmak üzere plazma zarından ayrılır. Elektron mikrografı (en sağ) klatrin-kaplı çukurcuktan klatrin kaplı vezikülün oluşumunu göstermektedir. (B) Klatrin-kaplı çukurcuğa ait elektron mikrografı klatrin ağının sepet benzeri yapısını göstermektedir (A, M. M. Perry, 1979. *J. Cell Science* 34: 266; B, John E. Heuser'ın izniyle, Washington Üniversitesi, Tıp Fakültesi)

Klatrinler, zarın biçimini bozan ve hücre içerisine doğru çukurcuklar oluşturan sepet benzeri bir yapıda toplanır. Bu yapı klatrin-kaplı çukurcukları oluşturmak üzere reseptör ve bağlandığı molekülleri (ligand) içinde bulunduran zardan tomurcuklanır. GTP'ye bağlayıcı protein olan **dinamin**, vezikül tomurcuklamasında önemli rol oynar. Dinamin, hücre içine doğru olan çukurcukların boynunda yüzük şeklinde toplanır ve GTP'nin hidrolizi sayesinde konformasyonel değişime uğrar. Bu da alttaki zarın fizyonu ile hücre içinde serbest **klatrin-kaplı vezikülleri** oluşturur. Hücre dışı sıvılar da veziküller plazma zarından oluşmaya başladıkları esnada onlara dahil olurlar. Bir anlamda kaltrin aracılı endositoz, belirli makromoleküllerin hücre içerisine alınmasının yanı sıra hücre dışı sıvılarının ve içeriklerinin de seçici olmayan şekilde hücre içine alınması ile sonuçlanır.

Animasyon 14.4
sites.sinauer.com/cooper7e/a14.4
Klatrin-Kaplı Çukurlar ve Veziküller Plazma zarı üzerindeki reseptör molekülleri klatrin-kaplı çukurlar oluşturmak üzere birleşir, hücre dışında bulunan belirli makromoleküllere bağlanır ve daha sonra klatrin-kaplı veziküller şeklinde membrandan kopar.

Memeli hücreleri tarafından kolesterolün alınımı, klatrin-aracılıklı endositozun moleküler düzeyde anlaşılmasında anahtar model olmuştur. Kolesterol, kan dolaşımında lipoprotein partikülleri şeklinde taşınır ki, bunların en yaygın olanı **düşük-yoğunluklu lipoprotein** ya da **LDL** olarak bilinir. Herbir LDL partikülü, kolesterol, fosfolipid ve tek bir apolipoprotein B100 molekülünden oluşan bir kılıf ile kolesterol esterleri içeren çekirdek yapısına sahiptir (**Şekil 14.37**). Michael Brown ve Joseph Goldstein'in laboratuvarlarındaki çalışmalar, LDL'nin memeli hücreleri tarafından alınımı için, LDL'nin klatrin-kaplı çukurlarda toplanmış olan özel hücre yüzey reseptörlerine bağlanmasının ve endositozla içeri alınmasının gerekti̇ğini ortaya koymuştur. Bir sonraki bölümde anlatıldığı gibi, reseptör daha sonra tekrar hücre zarına gönderilirken, LDL lizozomlara aktarılır ve burada kolesterol hücre tarafından kullanılmak üzere serbestleşir.

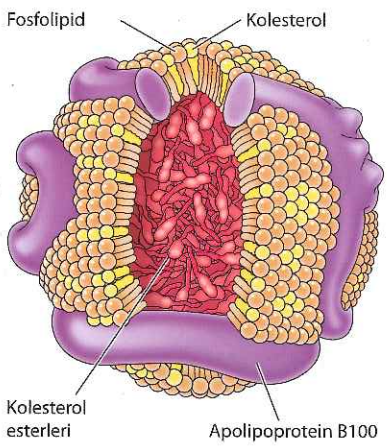
Bilgi İçin

LDL kolesterol damarları tıkayabildiğinden ve kalp krizi ile felce yol açtığından dolayı "kötü kolesterol" olarak tanımlanır. Bunun aksine, HDL kolesterol LDL kolesterolu damarlardan uzaklaştırabildiğinden "iyi kolesterol" olarak tanımlanır.

Bu olayın ana hatlarının kavranması, kalıtılan ve ailesel hiperkolesterolemi olarak bilinen bir hastalığa sahip hastaların çalışılmasıyla sağlandı. Bu hastalığı taşıyan kişiler çok yüksek serum kolesterolüne sahip olup, yaşamın erken döneminde kalp kriziyle yüzleşirler. Brown ve Goldstein bu hastaların hücrelerinin, hücre dışı sıvıdan LDL'yi alamadıklarını, bu nedenle dolaşımda yüksek oranda kolesterol biriktiğini buldular. Daha sonraki çalışmalar, normal bireylerin hücrelerinin LDL için bir reseptöre sahip olduklarını, bunların kaplanmış çukurlarda toplandıklarını ve ailesel hiperkolestroleminin LDL reseptöründeki kalıtılan mutasyonlardan kaynaklandığını gösterdi. Bu

Bilgi İçin

Statinler, hiperkolestrolemi tedavisinde kullanılan önemli bir ilaç grubudur. HMG-CoA reduktaz enzimini inhibe etmek süretiyle kolesterol biyosentezini engelleyerek etki ederler.



Şekil 14.37 LDL'nin yapısı LDL'nin herbir partikülü yağlı çekirdek yapısı içerisinde yaklaşık 1500 kolesterol ester molekülüne sahiptir. Çekirdek, 500 kolesterol molekülü, 800 fosfolipid molekülü ve tek bir apolipopratein B100 molekülü içeren bir kılıf ile sarılıdır.

Anahtar Deney

LDL Reseptörü

Familial Hypercholesterolemia: Defective Binding of Lipoproteins to Cultured Fibroblasts Associated with Impaired Regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity

Michael S. Brown and Joseph L. Goldstein

University of Texas Southwestern Medical School, Dallas

Proceedings of the National Academy of Science USA, 1974, Volume 71, pages 788-792

Bağlam

Ailesel hiperkolesterolemi (FH) genetik bir hastalıktır, hastalar çok yüksek serum kolesterol düzeyine sahiptir ve yaşamlarının erken döneminde kalp krizi riski taşırlar. Michael Brown ve Joseph Goldstein 1972'de, aşırı kolesterol üretiminin kolesterol biyosentezini düzenleyen kontrol mekanizmasındaki bir bozukluktan kaynaklandığı düşüncesinden yola çıkarak, bu hastalığı anlama çabalarını başlattılar. Bu hipotezle tutarlı olarak, insan normal fibroblast kültür ortamına LDL eklenmesinin, kolesterol biyosentez yolunda hız sınırlayıcı enzim olan 3-hidroksi -3-metilglutaril koenzim A redüktaz'ı (HMG-CoA redüktaz) inhibe ettiğini buldular. Bunun aksine, FH hastalarının hücrelerine LDL ilavesi HMG-CoA redüktaz aktivitesini etkilemedi ve FH hücreleri aşırı kolesterol üretti.

Bunu izleyen deneyler, sürpriz bir şekilde, HMG-CoA redüktaz aktivitesindeki bu anormalliğin HMG-CoA redüktaz genindeki bir mutasyondan kaynaklanmadığını gösterdi. HMG-CoA redüktaz denetimindeki bu anormalliğin, FH hücrelerinin LDL'den kolesterolü ayıramamasından kaynaklandığı anlaşıldı. Brown ve Goldstein 1974'de, FH hücrelerindeki aksaklığın, hücre yüzeyindeki reseptöre LDL bağlanma hatası olduğunu gösterdiler. LDL reseptörünün tanımlanması temelleri sarsan bir dizi araştırmaya yol açtı, Brown, Goldstein ve arkadaşları reseptör- aracılıklı endositoz yolunu betimlediler.

Deneyler

Brown ve Goldstein 1974'te yayınladıkları makalelerinde, normal bireylerin ve FH hastalarının fibroblastlarına radyoaktif işaretli LDL'nin bağlanmasını inceledikleri araştırmanın sonuçlarını yayınladılar. Kültür ortamına az miktarda, radyoaktif LDL eklenmesinden sonra, değişik inkübasyon sürelerinde hücrelere bağlanan radyoaktivite miktarı saptandı (şekle bakınız). İnkübasyon süresine bağlı olarak normal hücrelere artan miktarlarda radyoaktif LDL bağlandı. Önemli nokta, fazla miktarda işaretsiz LDL eklendiğinde radyoaktif LDL bağlanmasının azaltmasıydı ki bu, LDL'nin hücre yüzeyinde sınırlı sayıdaki bölge ile özgül etkileşime girerek bağlandığını gösteriyordu. Etkileşimin özgüllüğü daha sonra, diğer lipoproteinlerin aşırı miktarlarının dahi LDL bağlanmasını engelleyememesiyle belirlendi.

Normal fibroblastlarla elde edilen bu sonuçlara karşın FH hastalarına ait fibroblastlar radyoaktif LDL'yi özgül olarak bağlayamadı. Böylece, normal fibroblastların, FH hücrelerinde

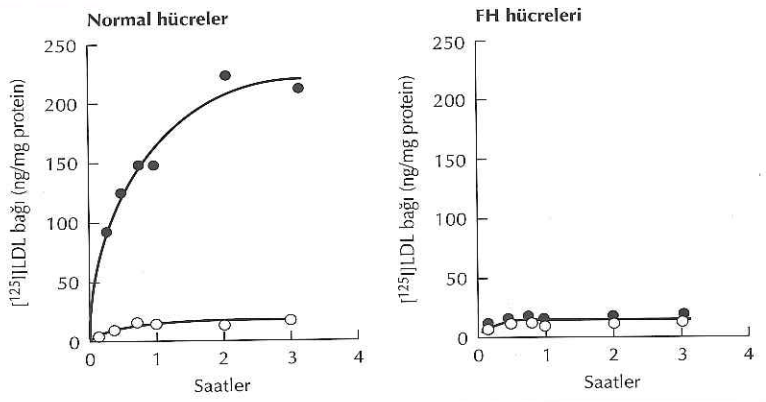
Michael S. Brown

Joseph L. Goldstein

bulunmayan ya da kusurlu olan, özgül bir LDL reseptörüne sahip oldukları anlaşıldı. Brown ve Goldstein, FH hücrelerinde gözlenen LDL bağlanma hatasının "bu hastalıktaki primer genetik bozukluğu gösterdiğine", LDL'nin HMG-CoA redüktazı inhibe edememesine ve böylece aşırı kolesterol üretimine neden olduğuna karar verdiler. Ek araştırmalar, normal fibroblastlara bağlanan LDL 'nin, hücrenin zar fraksiyonunda bulunduğunu ve bunun da LDL reseptörünün bir hücre yüzey proteini olduğuna işaret ettiğini gösterdi.

Etki

LDL reseptörünün tanımlanmasını takiben Brown ve Goldstein, hücre yüzeyine bağlanan LDL'nin süratle içeri alındığını ve lizozomlarda serbest kolesterole yıkıldığını



Normal ve FH hücrelerine radyoaktif LDL bağlanmasının zamana göre dağılımı. Hücreler, bol, işaretsiz LDL varlığında (açık sembol) ve yokluğunda (kapalı sembol) radyoaktif [^{125}I] LDL ile inkübe edildi. Daha sonra hücreler toplanarak bağlanan radyoaktif LDL miktarı belirlendi. Veriler, miligram hücre proteini başına, nanogram bağlı LDL olarak sunuldu.

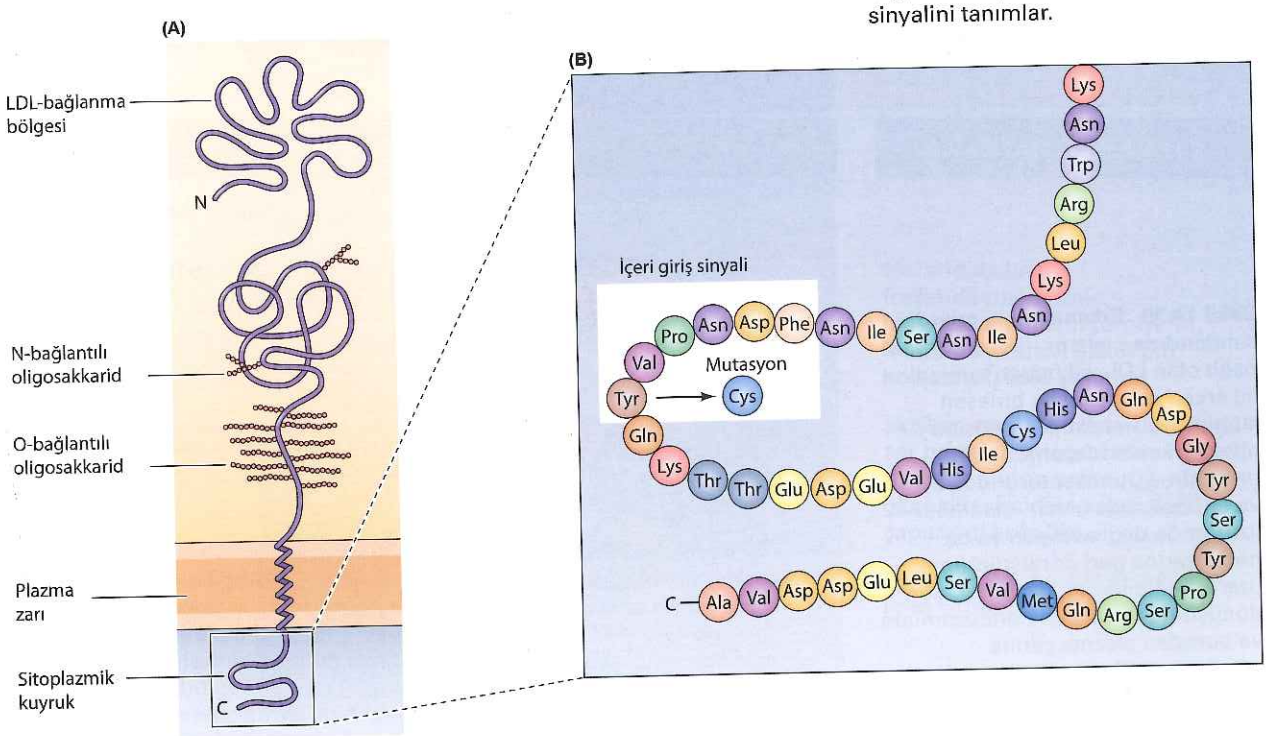
Anahtar Deney

gösterdiler. Daha sonra, Richard Anderson ile birlikte, LDL reseptörünün kaplı çukurlardan endositozla hücre içine alındığını kanıtladılar. Ayrıca, daha önceki çalışmaları LDL reseptörünün, hücre içinde ligandını bırakarak plazma zarına geri döndüğünü gösterdi. Böylece, kolesterol biyosentezini anlayabilmek amacıyla başlatılan çalışmalar, ökaryot hücrelerin makromolekülleri almak için kullandıkları çok önemli bir yolağın anlaşılmasına yol açtı ki bu bilimi ve bilim adamlarını beklenmedik, ancak heyecan verici yeni hedeflere yönlendiren yollara güzel bir örnektir.

mutasyonlar iki tipteydi. Ailesel hiperkolesterolemili hastaların çoğunun hücreleri, LDL alımı için özel bir yüzey reseptörünün gerektiğini gösterecek şekilde, LDL bağlama konusunda yetersizdi. Bunun dışında, hücreleri LDL'yi bağlayan ancak içeri alamayan birkaç hasta tanımlandı. Bu hastaların LDL reseptörlerinin kaplanmış kanallarda yoğunlaşamaması, kaplı kanalların reseptör-aracılıklı endositozda oynadıkları rolün önemini kanıtlıyordu.

LDL reseptörünün kaplı kanallarda toplanmasını engelleyen mutasyonlar reseptörün sitoplazmik kısmında bulunur ve tek bir tirozinin sisteine dönüşmesi gibi, fark edilmesi çok zor olabilir (**Şekil 14.38**). Daha ileri çalışmalarla, LDL reseptörünün alınma sinyali, esas tirozin dahil, altı amino asitlik bir dizi olarak belirlendi. Genellikle tirozin içeren benzer giriş sinyalleri, klatrin-kaplı çukurlar aracılığıyla hücre içine alınan diğer reseptörlerin sitoplazmik uzantılarında da bulundu.

Klatrin-kaplı veziküller, hücre içine alınmaları sonrasında kılıflarını hızla atarak erken endozomlarla birleşir. Burada veziküllerin içeriği geri dönüşüm sonucu plazma zarına gönderilmek ya da lizozomlara taşınmak üzere tasniflenir (bkz. Şekil 11.40). Geri dönüşüme uğrayacak moleküller (örneğin, hücre yüzey reseptörleri) daha sonra geri dönüşüm endozomlarına ve yeniden plazma zarına

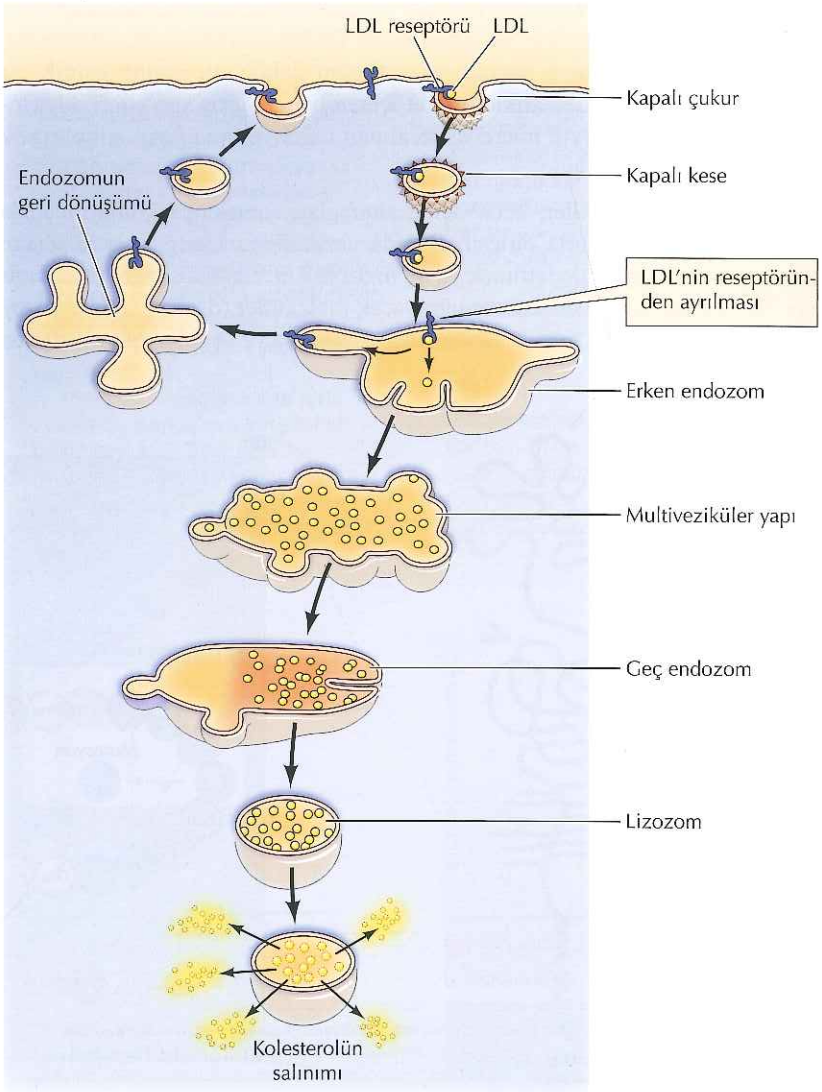


Şekil 14.38 LDL reseptörü (A) LDL reseptörü; hücre dışında 700 amino asit, 22 amino asitlik bir transmenbran α sarmal ve 50 amino asitlik bir sitoplazmik kuyruktan oluşur. N-ucundaki 292 amino asit LDL-bağlama bölgesini oluşturur. (B) Sitoplazmik uzantıdaki altı amino asit, ilk kez ailesel hiperkolestrolemide Tyr'in Cys'e mutasyonunun reseptörün kaplı çukurda toplanmasını engellemesiyle farkedilen içeri giriş sinyalini tanımlar.

aktarılır. Bunun aksine, yıkılmak üzere tasniflenen moleküller, çok veziküllü yapılara, sonrasında da geç endozomlara ve lizozomlara taşınırlar.

Erken endozomların önemli bir özelliği, zar H^+ pompasının çalışması sonucu asidik bir iç pH'yı (6.0 ile 6.2 civarında) korumalarıdır. Bu asidik pH, erken endozom bölmesi içerisinde birçok ligandın reseptöründen ayrılmasına yol açar. Bu ayrılmanın ardından reseptörler ve ligandlar farklı hücre içi hedeflere taşınabilirler. Reseptöründen erken endozom içerisinde ayrılan LDL klasik bir örnektir (**Şekil 14.39**). Reseptör daha sonra, endozomların tübüler uzantılarından tomurcuklanan taşıma vezikülleriyle plazma zarına geri döner. Buna karşın LDL lizozomlara aktarılır (endozom içerisindeki diğer çözünür içerikle birlikte) ve burada yıkımı ile kolesterol elde edilir.

Birçok reseptör (LDL reseptörü gibi) bağlı ligandların erken endozom içerisinde bırakarak geri döndüğünden, reseptör-aracılıklı endositoz ile alınan zar proteinlerinin plazma zarına geri dönmeleri kaçınılmazdır. Bu reseptörlerin



Şekil 14.39 Erken endozomlarda sınıflandırma işlemi Reseptörüne bağlı olan LDL, kılıfından ayrılan ve erken endozom ile birleşen klatrin-kaplı veziküller içerisine alınır. Erken endozomun asidik pH'sında, LDL reseptöründen ayrılır ve endositoz ile alınan maddeler lizozomda degradasyon ya da hücre zarına geri dönüştürülmek üzere sınıflandırılır. Reseptör, geri dönüşümden sorumlu endozomlara ve buradan plazma zarına gönderilir. LDL, geç endozomlara ve degrade edilip kolesterolun serbest kaldığı lizozomlara taşınır.

geri dönüşümü ligandlarının sürekli olarak içeri alınmasına neden olur. Örneğin, her LDL reseptörü, yaklaşık olarak her 10 dakikada bir plazma zarından erken endozoma ve geriye olmak üzere bir tur yapar. Endositozdan kaynaklanan zar trafiğinin yoğunluğu, geri dönüşüm yolağının önemini daha da artırır. Klatrin-kaplı çukurlar tipik olarak, plazma zarının yüzey alanının % 1 ile 2'sini kaplar ve tahmini ortalama var oluş süreleri 1 ile 2 dakikadır. Bu değerlere göre yaklaşık olarak her 2 saatte bir plazma zarının tamamına eşdeğer büyüklükte hücre yüzey alanının klatrin-aracılıklı endositozla içeri alındığı hesaplanabilir. Tekrar yerine koyma çoğunlukla reseptör geri dönüşümü ile gerçekleşir. Böylece bir saatte hücre yüzeyinin sadece %5 kadarı yeniden sentezlenir.

Klatrinden bağımsız endositoz

Hücreler, ayrıca **klatrinden-bağımsız endositoza** ait birkaç yolağa sahiptir. Klatrin-aracılı endositozun aksine, klatrin-bağımsız endositozda özelleşmiş plazma zar reseptörlerinin seçilimi ya da kaplı vezikül oluşumu gözlemlenmez. Klatrin-bağımsız endositoz yolaklarından bir tanesi önceden tartışılan makropinositozdur. Her ne kadar hücre içerisine hızlıca alınıyor olmalarından ziyade kaveolaların çoğu plazma zarının sabit bölgeleri olarak görünse de kaveolaların hücre içerisine alınması (bkz. Şekil 14.15) klatrinden-bağımsız endositozun bir başka mekanizmasıdır. Ayrıca taşınan kargo ve vezikül oluşumunda yer alan hücresel moleküllere dayanarak birkaç farklı klatrinden-bağımsız endositoz yolları tanımlanmıştır. Örneğin, klatrinden-bağımsız endositozun bir yolağı, GPI-kancalı plazma zar proteinlerinin hücre içerisine alınımında rol oynar. Bu proteinlerin endositozu plazma zarı kolesterolüne bağlıdır ve lipid yamalarında kümelenmesi ile düzenleniyor olabilir. Klatrin aracılı endositozun bir olası rolü de plazma zarı proteinlerinin hücre içine alınımı ve lizozomlardaki degradasyonuna ile kademeli gerçekleşen geri dönüşümleridir. Ancak, hem mekanizmaları hem de klatrinden bağımsız endositozun biyolojik rolleri halen aktif araştırma konuları olarak yer almaktadır.

Bilgi İçin

Kolera toksinleri gibi belirli bakteryal protein toksinler, lipid yığınlarında bulunan glikolipidlere bağlanır ve endositoz ile hücre içerisine alınır. Endositik vezikül içindeyken de toksin sekretuvar yol üzerinden sitoplazmaya giriş yapar ve burada toksik etkisini gösterir.

ÖZET

Plazma Zarının Yapısı

- ***Lipid çift tabaka:*** Plazma zarının temel yapısı fosfolipid çift tabakadır, glikolipidler ve kolesterol de içerir.

- ***Plazma zarı proteinleri:*** Zardaki proteinler özel zar işlevlerinin yerine getirilmesinden sorumludurlar. Zarlar, proteinlerin fosfolipid çift tabaka içerisine yerleştiği bir akışkan mozaik görünümündedir Bkz. **Video 14.1.**

- ***Plazma zarı bölgeleri:*** Proteinler her ne kadar fosfolipid çift tabaka üzerinde lateral olarak serbest dağılım gösteriyor olsa da birçok proteinin hareketi kısıtlıdır. Plazma zarı farklı bölgelerden oluşur. Epitel hücrelerinin plazma zarı farklı görevlere sahip olan apikal ve bazolateral bölgelere ayrılmıştır. Plazma zar proteinlerinin hareketi ayrıca hücre iskeleti ve lipid ve diğer proteinleri içeren belirli bölgeler ile olan bağlantıları üzerinden de kısıtlıdır. Bkz. **Video 14.2.**

ANAHTAR SÖZCÜKLER

fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, sfingomiyelin, fosfatidilinositol, glikolipid, kolesterol, lipid yığınları

akışkan mozaik modeli, periferal zar proteini, integral zar proteini, transmembran protein, porin, glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapası, glikokaliks

apikal bölge, bazolateral bölge, lipid yığını, kaveole

ÖZET

Küçük Moleküllerin Taşınması

- ***Kolaylaştırılmış difüzyon ve taşıyıcı proteinler:*** Biyolojik moleküllerin çoğunun geçişi, polar ve yüklü moleküllerin hidrofobik iç kısımla etkileşmeden plazma zarını geçmelerini sağlayan taşıyıcı ya da kanal proteinleri aracılığıyla gerçekleşir.

kolaylaştırılmış difüzyon, taşıyıcı protein, kanal proteini

- ***İyon kanalları:*** İyon kanalları seçilen iyonların plazma zarından hızlı geçişini organize eder. Özellikle, elektrik uyarılarının iletiminden sorumlu oldukları kas ve sinir hücrelerinde iyi tanımlanmışlardır. Bkz. **Animasyon 14.1**

akuaporin, iyon kanalı, ligand-kapılı kanal, voltaj-kapılı kanal, Nemst denklemi, aksiyon potansiyeli

- ***ATP hidroliziyle desteklenen aktif taşıma:*** ATP hidrolizinden elde edilen enerji, moleküllerin elektrokimyasal gradientlerine karşı taşınabilmesini sağlar. Bkz. **Animasyon 14.2.**

aktif taşıma, iyon pompası, Na^+-K^+ pompası, Na^+-K^+ ATPaz, ABC taşıyıcı

- ***İyon gradientiyle yürütülen aktif taşıma:*** İyon gradienti, diğer moleküllerin aktif taşınımını desteklemek üzere sıklıkla kullanılır.

simport, uniport, antiport

Endositoz

- ***Fagositoz:*** Hücreler, bakteri ve hücre artıkları gibi büyük partikülleri fagositozla alırlar. Bkz. **Animasyon 14.3.**

endositoz, fagositoz, fagozom, fagolizozom, makropinositoz

- ***Klatrin-aracılı endositoz:*** En iyi tanımlanmış endositoz şekli, özgül moleküllerin seçili alımını sağlayan, reseptör-aracılıklı endositozdur. Bkz. **Animasyon 14.4** ve **Video 14.3.**

klatrin-aracılı endositoz, klatrin-kaplı çukur, klatrin-kaplı vezikül, dinamin, düşük-yoğunluklu lipoprotein (LDL)

- ***Klatrinden bağımsız endositoz:*** Hücrelerde klatrinlere bağımlı olmayan birkaç yolak daha bulunur.

Klatrinden bağımsız endositoz

ANAHTAR SÖZCÜKLER

Atıf

Hücre
Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Sorular

1. Periferal membran proteinleri, integral membran proteinlerinden nasıl ayırt edilir?
2. Frye ve Edidin'in hücre füzyon deneyleri membran yapısının sıvı mozaik modelini nasıl desteklemektedir? Eğer füzyona uğrayan hücreleri 2°C'de inkübe etmiş olsaydılar ne gibi sonuçlar elde edeceklerdi?
3. Lipid yığınları nedir ve görev aldıkları hücresel olaylar nelerdir?
4. Hücre iskeleti ile bağlantı plazma zarının bölgelerinin oluşmasına nasıl katkıda bulunur?
5. Mürekkep balığı aksonunun içinde K^+ konsantrasyonu hücre dışındakine kıyasla 20 kez daha yüksektir ve bu, -75 mV denge hali zar potansiyeli meydana getirir. Hücre içindeki K^+ konsantrasyonu dışarıdakinden sadece 10 kat fazla olsaydı, denge hali zar potansiyeli ne olurdu? Gerçek, dinlenme hali zar potansiyeli (-60 mV), -75 mV'luk K^+ denge potansiyelinden neden farklıdır? ($R = 1.98 \times 10^{-3}$ kcal/mol/deg, $T = 298$ K, $\ln(x) = 2.3\log_{10}(x)$, F=23kcal/V/mol olarak verilmiştir.)
6. Kürare nikotinik asit reseptörlerine bağlanır ve onların açılmasını engeller. Kasların kasılması üzerine nasıl etki edecektir?

7. K^+ kanallarının selektivite filtresi K^+ ve Na^+ iyonlarını nasıl ayırt etmektedir?
8. Glukoz, doğrudan ATP kullanılmaksızın ince bağırsak epitel hücrelerinde nasıl konsantrasyon gradiyentine karşı taşınabilmektedir?
9. *Mdr* geni kanser hücrelerinde ilaç dirençliliğini nasıl sağlar?
10. Brown ve Goldstein, LDL'nin normal hücrelerin yüzeyinde kısıtlı sayıda özgül bağlanma bölgelerine bağlandığını nasıl belirledi?
11. Ailesel hiperkolesterolemisi olan çocuklardan elde edilen hücreler üzerindeki çalışmalar reseptör aracılı endositoz mekanizması hakkında ne göstermiştir?
12. Aktin polimerizasyon inhibitörü fagositozu nasıl etkiler? Bu durum klatrin-aracılı endositozu etkiler mi?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar (Her ana bölüm için en önemli derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Plazma Zarının Yapısı

Cao, X., M. A. Surma and K. Simons. 2012 . Polarized sorting and trafficking in epithelial cells. *Cell Res.* 22: 793-805. [R]

Diesenhofer, J., 0. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel. 1985. The structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis* at 3-Å resolution. *Nature* 318: 618-624. [P]

Engelman, D. M. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438: 578-580. [R]

Hansen, C. G. and B. J. Nichols. 2010. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol.* 20: 177-186

Head, B. P., H. H. Patel and P. A. Insel. 2014. Interactions of membrane / lipid rafts with the cytoskeleton : impact on signaling and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1838:532-545. [R]

Li, L., X . Shi, X. Guo, H. Li and C. Xu. 2014. Ionic protein-lipid interaction at the plasma membrane: what can the charge do? *Trends Biochem. Sci.* 39: 130-140. [R]

Lingwood, D. and K. Simons. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327: 46-50. [R]

Moraes, I., G. Evans, J. Sanchez-Weatherby, S. News tead and P. D. S. Stewart. 2014. Membrane protein structure determination--the next generation. *Biochim. Biophys. Acta* 1838: 78-87. [R]

Nassoy, P. and C. Lamaze. 2012. Stressing caveolae: new role in cell mechanics. *Trends Cell Biol.* 22: 381-389. [R]

Nicolson, G. L. 2014. The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta* 1838: 1451-1466. [R]

Owen, D. M., A. Magenau, D. Williamson and K. Gaus. 2012. The lipid raft hypothesis revisited - New insights on raft composition and function from superresolution fluorescence microscopy. *Bioessavs* 34: 739-747. [R]

Parton, R. G. and M. A. del Pozo. 2013. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 98-112. [R]

Rees, D. C., H. Komiya, T. O. Yeates, J. P. Allen and G. Feher. 1989. The bacterial photosynthetic reaction center as a model for membrane proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 607-633. [R]

Rodriguez-Boulon, E. and I. G. Macara. 2014. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 225-242. [R]

Simons, K. and M. J. Gerl. 2010. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 688-699. [R]

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 247-296. [R]

Singer, S. J. and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731. [P]

van Meer, G., D. R. Voelker and G. W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 112-124. [R]

Küçük Moleküllerin Taşınması

Bell, G. I., C. F. Burant, J. Takeda and G. W. Gould. 1993. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J. Biol. Chem.* 268: 19161-19164. [R]

Borgnia, M., S. Nielsen, A. Engel and P. Agre. 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. Ann. Rev. Biochem. 68: 425-458. [R]

Catterall, W. A. 2010. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron* 67: 915-928. [R]

Changeux, J.-P. and A. Taly. 2008. Nicotinic receptors, allosteric proteins and medicine. *Trends Mol. Med.* 14: 93-102. [R]

Gadsby, D. C. 2007. Structural biology: ion pumps made crystal clear. *Nature* 450 : 957-959. [R]

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117: 500-544. [P]

MacLennan, D. H., W. J. Rice and N. M. Green. 1997. The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo) plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPases. *J. Biol. Chem.* 272: 28815-28818. [R]

Maurel, C. 2007. Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Lett.* 581: 2227-2236. [R]

Morth, J. P., B. P. Pedersen, M. S. Toustrup-Jensen, T. L. Sorensen, J. Petersen, J. P. Andersen, B. Vilsen and P. Nissen. 2007. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450: 1043-1049. [P]

Olesen, C., M. Picard, A. M. Winther, C. Gyrup, J.P. Marth, C. Oxvig, J. V. Moller and P. Nissen. 2007. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature* 450: 1036-1042. [P]

Pedersen, B. P., M. J. Buch-Pedersen, J. P. Morth, M.G. Palmgren and P. Nissen. 2007. Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* 450: 1111-1114. [P]

Rees, D. C., E. Johnson and O. Lewinson. 2009. ABC transporters: the power to change. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 218-227. [R]

Shinoda, T., H. Ogawa, F. Cornelius and C. Toyoshima. 2009. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 A resolution *Nature* 459: 446-450. [P]

Sun, L., X. Zeng, C. Yan, X. Sun, X. Gong, Y. Rao and N. Yan. 2012. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUTl-4. *Nature* 490: 361-366. [P]

Thorens, B. and M. Mueckler. 2010. Glucose transporters in the 21st Century. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298: E141- E145. [R]

Toyoshima, C. and G. Inesi. 2004. Structural basis of ion pumping by Ca^{2+}-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 73: 269-292. [R]

Ward, J. M., P. Maser and J. I. Schroeder. 2009. Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. *Ann. Rev. Physiol.* 71: 59-82. [R]

Endositoz

Brown, M. S. and J. L. Goldstein. 1986. A receptor-mediat ed pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47. [R]

Campelo, F. and V. Malhotra . 2012. Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Ann. Rev. Biochem.* 81: 407-427. [R]

Doherty, G. J. and H. T. McMahon. 2009.Mechanisms of endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 78: 857-902. [R]

Ferguson, S. M. and P. De Camilli. 2012. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 75-88. [R]

Flannagan, R. S., V. Jaumouille and S. Grinstein. 2012. The cell biology of phagocytosis. *Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 7: 61-98. [R]

Kirchhausen, T., D. Owen and S. C. Harrison. 2014. Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 6:a016725. [R]

Kumari, S., M.G. Swetha and S. Mayor. 2010. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res.* 20: 256-275. [R]

Maldonado-Baez, L., C. Williamson and J. G. Donaldson. 2013. Clathrin-independent endocytosis: a cargo-centric view. *Exp. Cell Res.* 319: 2759-2769. [R]

Mayor, S. and R. E. Pagano. 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 603-612. [R]

McMahon, H. T. and E. Boucrot. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 125: 517-533. [R]

Schmid, S. L. and V. A. Frolov. 2011. Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 27: 79-105. [R]

Swanson, J. A. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 639-649. [R]

Traub, L. M. and J. S. Bonifacino. 2013. Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 5:a016790. [R]

BÖLÜM 15

Hücre Duvarları, Ekstraselüler Matriks ve Hücre Etkileşimleri

Hücre Duvarı 571

Ekstraselüler Matriks ve Hücre-Matriks Etkileşimleri 577

Hücre-Hücre Etkileşimleri 587

Anahtar Deney
İntegrinin Karakterizasyonu 584

Moleküler Tıp
Aralık Bağlantı Hastalıkları 593

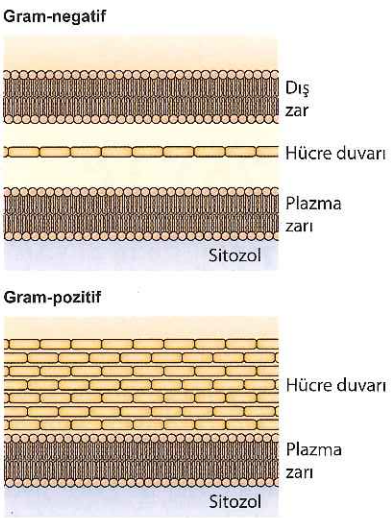
Hücre sınırlarının plazma zarıyla belirlenmesine karşın birçok hücre, salgılanan makro moleküllerden oluşan bir çözünmez katmanla kuşatılmıştır. Bakteri, mantar, alg ve yüksek bitkilerin hücreleri, hücreye dahil bir kısım olan, sert bir duvarla çevrilidir. Her ne kadar hücre duvarlarıyla kaplanmasalar da, dokuları oluşturan hayvan hücreleri proteinlerden ve polisakkaridlerden oluşan bir ekstraselüler matriks içine gömülüdür. Ekstraselüler matriks sadece hücre ve dokulara destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücre davranışını düzenlemede önemli roller oynar. Hücrelerin ekstraselüler matriks ile etkileşimleri, hücre iskeletinin tutunmasını sağlar ve hücre şekli ile hareketini düzenler. Aynı şekilde, hücreler arasındaki doğrudan etkileşim, hem bitki hem de hayvan dokularında hücrelerin organizasyonu için anahtar rol oynamasının yanı sıra hücrelere komşuları ile iletişim kurmaları için kanallar sağlar.

Hücre Duvarları

Bakteri ve pek çok ökaryotik hücre çeşidini (mantar, alg, ve daha yüksek yapılı bitkiler) çevreleyen sert hücre duvarları, hücre şeklini belirler ve hücreleri ozmotik basıncın bir sonucu olarak ortaya çıkabilen şişme ve patlamadan korur. Ortak işlevlerine rağmen, bakterilerin ve ökaryotların hücre duvarları yapısal olarak çok farklıdır. Bakteriyel hücre duvarları, tüm hücrenin etrafında kovalent bir kabuk oluşturan ve kısa peptidler ile çapraz bağlanmış polisakkaridlerden oluşur. Bunun aksine, ökaryotların hücre duvarları esas olarak jel benzeri bir matriks içine gömülü polisakkaridlerden oluşur. Bitki hücre duvarları, sabit yapılar olmaktan ziyade, hem bitkinin gelişimi sırasında hem de çevreden gelen sinyallere yanıt olarak değiştirilebilir. Bu nedenle bitkilerin hücre çeperleri, bitki dokularının organizasyonunun ve tüm bitki yapısının belirlenmesinde önemli roller oynamaktadır.

Bakteri hücre duvarları

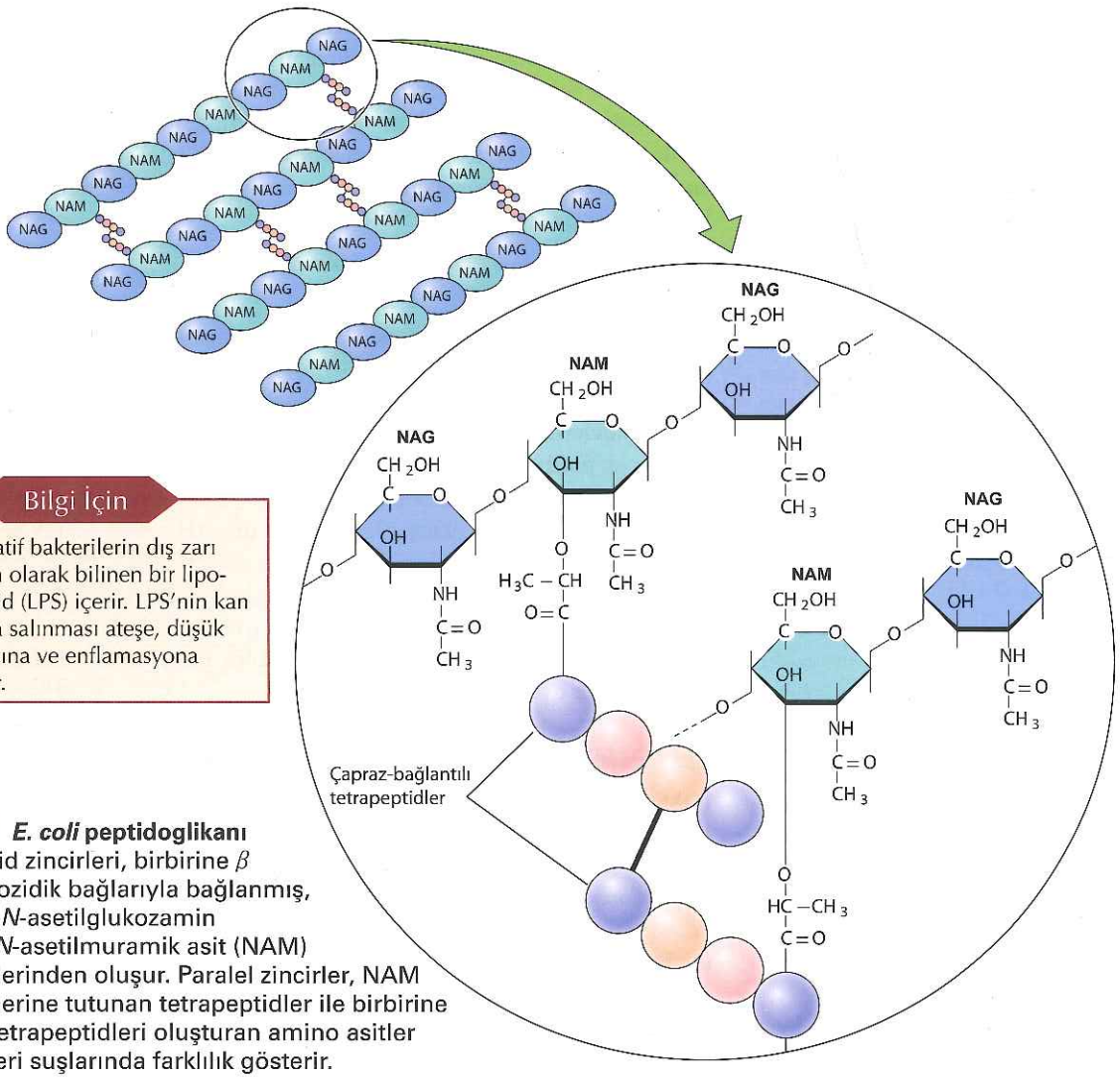
Bakterilerin sert hücre duvarları ozmotik basınca karşı koruma sağlar ve çeşitli tipteki bakterilerin karakteristik şekillerini belirler. Örneğin, bazı bakteriler (*E. coli* gibi) çubuk şeklinde iken diğerleri küresel (örn, *Pneumococcus* ve *Staphylococcus)* ya da sarmalsı (örn., frengiye neden olan spiroket *Treponema pallidum*) şeklindedir. Ayrıca bakteriler hücre duvarlarının yapısına göre iki büyük gruba ayrılır ki, bunlar, 1884'de Hans Christian Gram tarafından geliştirilmiş olan ve Gram boyası olarak bilinen boyama işlemiyle ayırt edilir (**Şekil 15.1**). Gram-negatif bakteriler (*E. coli* gibi), plazma zarının geçirgen bir dış zarla çevrildiği çift zar sistemine sahiptir. Bu bakteriler, iç ve dış zarlarının



Şekil 15.1 Bakteri hücre duvarları Gram-negatif bakterilerin plazma zarları, dış zarın altında ince bir hücre duvarıyla çevrilidir. Gram-pozitif bakterilerin dış zarları bulunmaz ve bunlar kalın hücre duvarına sahiptir.

arasına yerleşmiş ince bir hücre duvarına sahiptir. Buna karşın Gram-pozitif bakteriler (yaygın insan patojeni *Staphylococcus aureus* gibi) çok daha kalın bir hücre duvarıyla çevrilmiş tek bir plazma zarına sahiptir.

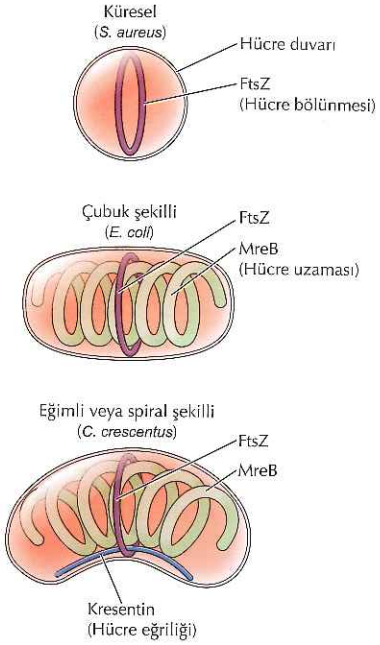
Bu yapısal farklılıklarına karşın Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin her ikisinin de hücre duvarlarındaki ana bileşen, kısa peptidlerle birbirine bağlı doğrusal polisakkarid zincirlerinden oluşan bir **peptidoglikandır** (Şekil 15.2). Çapraz bağlı bu yapı nedeniyle peptidoglikan, tüm bakteri hücresinin çevresinde, güçlü, kovalent bir kabuk oluşturur. İlginç bir şekilde, hücre duvarlarının farklı yapısı bakterileri bazı antibiyotiklere duyarlı kılar. Örneğin penisilin, ayrı peptidoglikan zincirleri arasında çapraz bağlantıları kuran enzimi engelleyerek hücre duvarı yapılanmasını ve bakteri üremesini durdurur.



Bilgi İçin

Gram-negatif bakterilerin dış zarı endotoksin olarak bilinen bir lipo-polisakkarid (LPS) içerir. LPS'nin kan dolaşımına salınması ateşe, düşük kan basıncına ve enflamasyona neden olur.

Şekil 15.2 *E. coli* peptidoglikanı Polisakkarid zincirleri, birbirine β (1→4) glikozidik bağlarıyla bağlanmış, değişimli, *N*-asetilglukozamin (NAG) ile *N*-asetilmuramik asit (NAM) monomerlerinden oluşur. Paralel zincirler, NAM monomerlerine tutunan tetrapeptidler ile birbirine bağlanır. Tetrapeptidleri oluşturan amino asitler farklı bakteri suşlarında farklılık gösterir.

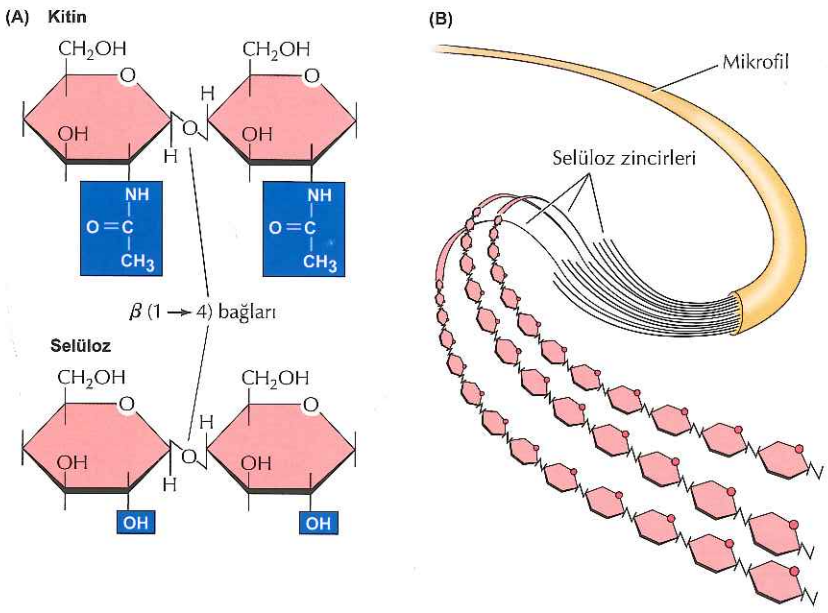


Şekil 15.3 Bakteriyel hücre iskeleti proteinleri hücre duvarı sentezini düzenler FtsZ, bir ökaryotik tübülin, hücre bölünmesi bölgesinde bir halka yapısı oluşturur ve yavru hücreler arasında yeni hücre duvarı sentezini yönetir. Çubuk şeklinde bakteriler ayrıca, bir aktin homoloğu olan ve uzama sırasında hücre duvarı sentezini yöneten MreB'yi içerir. Ara filaman benzeri proteinler (örn., kresentin) kavisli ya da sarmal şekilli bakterilerin hücre duvarındaki kavislenmesinden sorumludur.

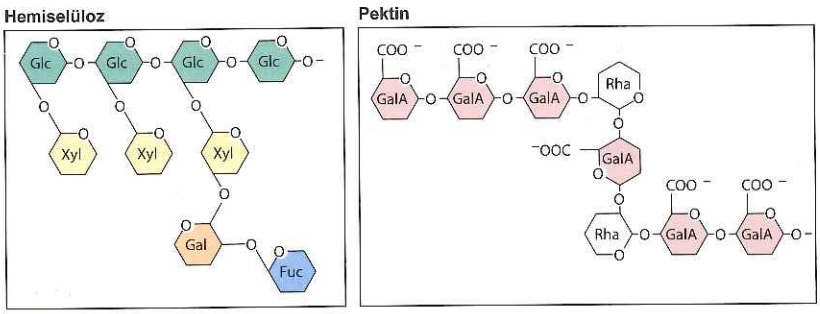
Hücre duvarı bakteriyel büyüme ve bölünme sırasında sürekli olarak büyür ve dolayısıyla bakteriyel hücrelerin karakteristik şekli hücre duvarı sentezini kontrol eden mekanizmalar tarafından yönetilir. İlginç olarak, bu durum bakteriyel hücre iskeleti proteinleri tarafından belirlenir (**Şekil 15.3**). Bakteride keşfedilen ilk hücre iskeleti proteini, FtsZ, ökaryotik tübülinin homoloğu olup hemen tüm bakterilerde (küresel, çubuk ve sarmal şeklinde) bulunur. FtsZ, hücre bölünmesinin olduğu yerde bir halka yapısı oluşturarak yeni oluşan yavru hücreleri ayıracak olan hücre duvarının sentezini yönetir. *E. coli* gibi çubuk şeklinde olan bakteriler, ayrıca bir aktin homoloğu olan hücre iskeleti proteini MreB'yi içerir. MreB hücre uzaması sırasında hücre duvarı sentezini yönetir. Son olarak da kavisli ya da sarmal şeklindeki bakteriler, hücre duvarının kavislenmesinden sorumlu olan ara filaman benzeri proteinlere (kresentin gibi) sahiptir.

Ökaryotik hücre duvarları

Bakterilerin aksine, ökaryotların hücre duvarları (mantar, alg ve yüksek bitkiler dahil) temel olarak polisakkaridlerden meydana gelmiştir (**Şekil 15.4**). Mantar hücre duvarlarının temel yapısal polisakkaridi, aynı zamanda yengeç kabuklarında olduğu gibi böceklerin ve artropodların dış iskeletini de oluşturan **kitindir**. Kitin bir N-asetilglukozamin polimeridir. Alglerin ve yüksek bitkilerin çoğunun hücre duvarları temel olarak, yeryüzünde en bol bulunan polimer olan **selülozdan** oluşmuştur. Selüloz, glukoz moleküllerinden oluşmuş



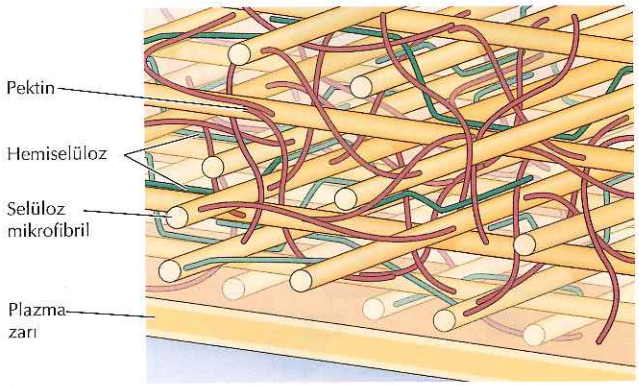
Şekil 15.4 Hücre duvarı polisakkaridleri (A) Mantar hücre duvarları ile yengeçlerin ve böceklerin dış iskeletlerinin temel polisakkaridi olan kitin, *N*-asetilglukozamin moleküllerinin doğrusal bir polimeri iken, selüloz glukozun doğrusal bir polimeridir. Peptidoglikanda olduğu gibi, karbohidrat monomerleri, polisakkaridin uzun ve düz zincirler oluşturmasına olanak veren β (1→4) bağlarıyla bağlıdır. (B) Paralel selüloz zincirleri mikrofibrilleri oluşturmak üzere bir araya gelir.



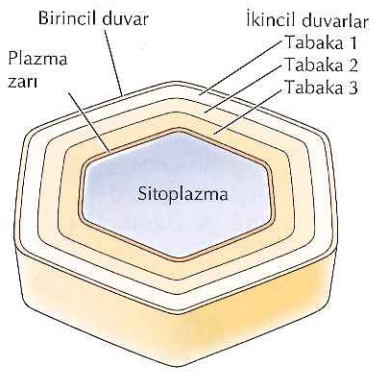
Şekil 15.5 Hemiselüloz ve pektin yapıları Temsili bir hemiselüloz (ksiloglikan), ksiloz, galaktoz (Gal) ve fukoz (Fuc) yan dalları bulunan bir glukoz (Glc) omurgasından oluşur. Temsili bir pektin (ramnogalakturonan) birçok yan zincirin bağlandığı galakturonik asit (GalA) ve ramnoz (Rha) birimlerinden oluşan bir belkemiği içerir.

doğrusal bir polimerdir ve genellikle 10,000'den fazla glukoz monomeri içerir. Gerek kitindeki gerekse selülozdaki glukoz molekülleri, polisakkaridin uzun düz zincirler oluşturmasına olanak veren β (1→4) bağlarıyla bağlanır. Plazma zarından ekstraselüler matrikse taşınma sonrasında, 36 tek selüloz zinciri birbirlerine parallel olarak birleşerek 3 nm uzunluğunda mikrofibriller oluşturur. Selüloz mikrofibrilleri uzunlamasına mikrometrelerce uzayabilir.

Bitki hücre duvarının içinde selüloz mikrofibrilleri, proteinlerden ve **hemiselüloz** ve **pektin** adı verilen diğer iki polisakkarid türünden oluşan bir matriks içerisine gömülüdür (**Şekil 15.5**). Hemiselülozlar, selüloz mikrofibrillerine hidrojen bağlarıyla bağlanan, yüksek oranda dallanmış polisakkaridlerdir (**Şekil 15.6**). Bu durum selüloz mikrofibrillerini, bitki hücre duvarının mekanik gücünden sorumlu, güçlü lif şeklinde sağlamlaştırır. Selüloz mikrofibrilleri ve hemiselülozlar, pektinler tarafından oluşturulan jel benzeri bir matriks içinde gömülüdür. Pektinler, çok sayıda, negatif yüklü galakturonik asit molekülü içeren, dallanmış polisakkaridlerdir. Bu yoğun negatif yükleri nedeniyle pektinler pozitif yüklü iyonlara (Ca^{2+} gibi) bağlanırlar ve jel oluşturmak üzere su moleküllerini tutarlar. Meyve suyuna pektin eklenerek reçel ve jöle yapımı, jel oluşturma özelliklerine bir örnektir. Son olarak hücre duvarları matriks içerisine katılan ve yapısal desteği artıran çeşitli glikoproteinler de içerir.



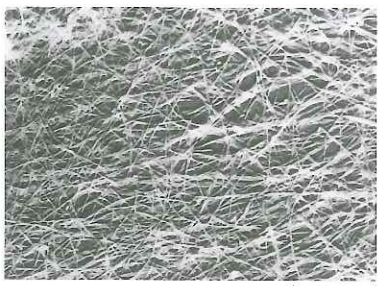
Şekil 15.6 Bitki hücre duvarı modeli Selüloz, tabakalar halinde dizilmiş olan mikrofibrillere organize olmuştur. Hemiselülozlar (yeşil) selüloz mikrofibrillerine bağlanarak, pektinlerden oluşan jel-benzeri bir matriksin içerisine gömülür.



Şekil 15.7 Birincil ve ikincil hücre duvarları İkincil hücre duvarları, birincil hücre duvarı ile plazma zarı arasına yerleşir. İkincil hücre duvarları sıklıkla, selüloz mikrofibrillerinin düzeniyle farklılaşan üç tabakadan oluşur. Elektron mikrografları birincil ve ikincil hücre duvarlarındaki selüloz mikrofibrillerini göstermektedir (Birincil hücre duvarı, F.C. Steward'ın izniyle)

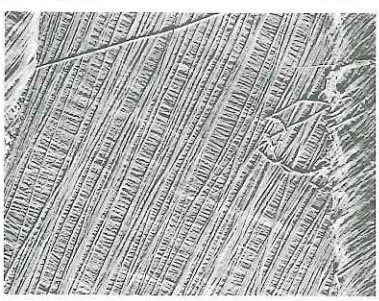
Bitki hücreleri geliştikçe, hücre duvarlarının hem yapısı hem de işlevi değişir. Büyümekte olan bitki hücrelerinin duvarları **(birincil hücre duvarları** olarak adlandırılır), hücrenin büyümesine olanak verecek şekilde, nispeten incedir. Hücrelerin büyümesi durunca, genellikle, plazma zarı ile birincil hücre duvarı arasına **ikincil hücre duvarlarını** döşer (Şekil 15.7). Birincil ve ikincil hücre duvarları, kalınlıkları ve bileşimleri bakımından farklıdır. Birincil hücre duvarları, yaklaşık olarak eşit miktarlarda selüloz, hemiselüloz ve pektin içerir. Buna karşın daha sert olan ikincil hücre duvarları genellikle pektinden yoksundur. Birçok ikincil hücre duvarı, fenol birimlerinin kompleks bir polimeri olan ve diğer polimerler arasındaki boşluklara yerleşen **lignin** ile daha da güçlendirilmiştir. Lignin odunun sağlamlığından ve yoğunluğundan büyük ölçüde sorumludur. Lignin, jel oluştumak yerine, hücre duvarını dehidre ederek onu su geçirmez ve patojen yıkımına dayanıklı hale getirir ve böylelikle ağaçların yüzyıllarca hayatta kalmasını sağlar. Birincil ve ikincil hücre duvarlarında selüloz mikrofibrillerinin dizilimi de farklıdır. Birincil hücre duvarlarındaki selüloz iplikler gelişigüzel düzenlenirken, ikincil duvarlardakiler son derece düzenlidir (bkz. Şekil 15.7). İkincil hücre duvarları genellikle, selüloz ipliklerinin farklı yönlerde düzenlenmiş olduğu tabakalar oluşturur ve böylece, hücre duvarının gücünü büyük ölçüde artıran ince tabakalı bir yapı meydana gelir. Bu ikincil hücre duvarları birincil duvarlara göre hem daha kalın hem de daha serttir ve özellikle de suyu iletmekten ve bitkiye mekanik dayanıklılık sağlamaktan sorumlu hücre tiplerinde önemlidir.

Birincil duvar



1 μm

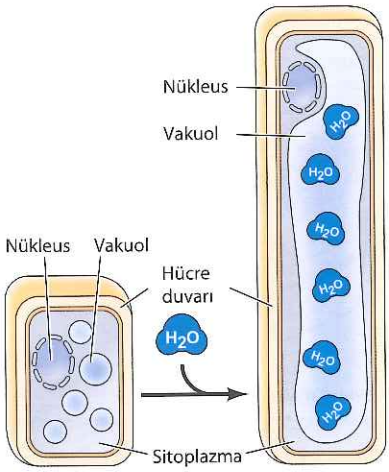
İkincil duvar



0.2 μm

Bitki hücre duvarlarının en önemli görevlerinden biri, ozmotik basınç nedeniyle hücrelerin şişmesini engellemektir. Hayvan hücrelerinin aksine bitki hücreleri (tıpkı bakteriler gibi), sitozolleri ile ekstraselüler sıvıları arasında ozmotik dengeyi sürdürmez. Sonuç olarak ozmotik basınç, hücre içine sürekli su akışını zorlar. Sert hücre duvarlarının, şişme ve patlamayı engellemesi sayesinde bitki hücreleri bu su akışına dayanır. Hücre içi hidrostatik basınç **(turgor basıncı** denir) gelişerek sonunda ozmotik basıncı dengeler ve içeri daha fazla su akışını durdurur.

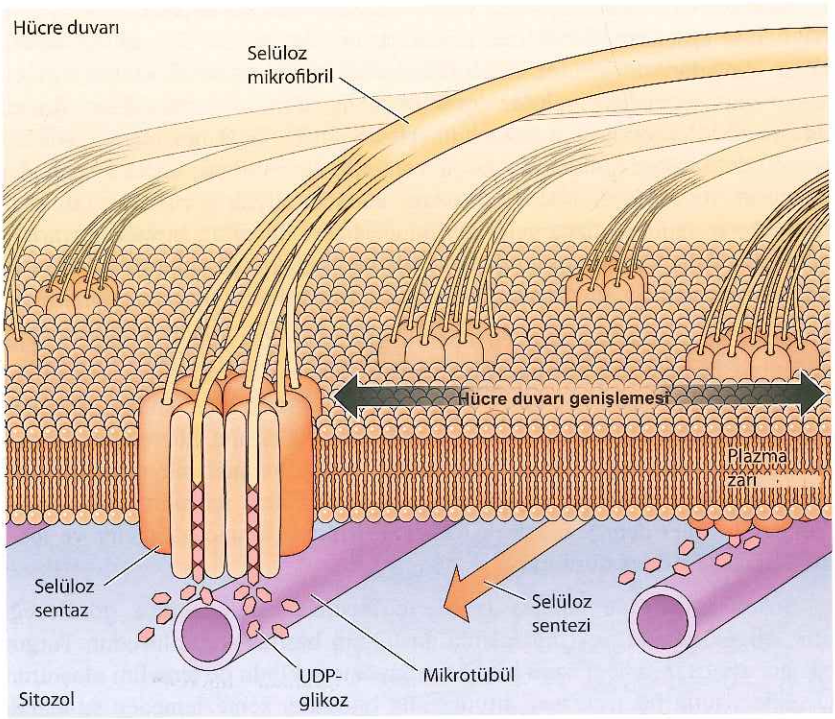
Susuz kalmış ve solmuş bitkilerin incelenmesiyle açıkça görüleceği gibi, turgor basıncı bitki hücresinin diriliğinin başlıca sorumlusudur. Turgor basıncı ayrıca, bitkilere özgü bir hücre büyüme şeklinin de temelini oluşturur. Özellikle, bitki hücresi, yeni sitoplazmik bileşikler sentezlemeden su alarak genişler (Şekil 15.8). Bu mekanizmayla genleşme, hücre duvarının bir bölgesini zayıflatarak turgor basıncının hücreyi bu yönde genişletmesine olanak sağlayan bitki hormonları **(oksinler)** tarafından uyarılır. Bu gerçekleştiğinde, hücre içerisine akan su büyük bir merkezi vakuolde birikir ve böylece hücre, sitozol hacmini artırmadan genişler. Bu genleşmeler, gelişme sürecinde, bitki hücrelerinin büyüklüğünde 10 ile 100 kat artışa neden olur.



Şekil 15.8 Bitki hücrelerinin genleşmesi Turgor basıncı bitki hücrelerinin büyüme sırasında, büyük merkezi kofulda birikmiş olan suyu alarak genleşmesini sağlar.

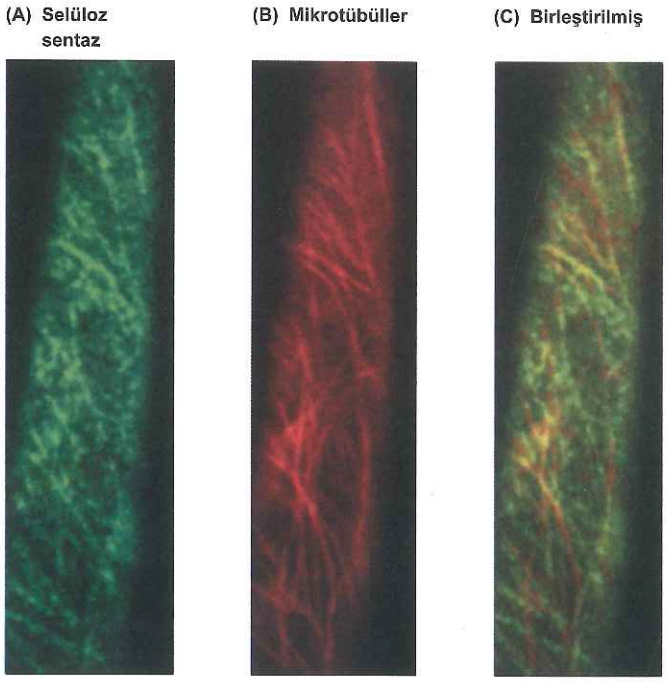
Hücreler genişledikçe, yeni hücre duvarı bileşenleri plazma zarının dışında biriktirilir. Hemiselüloz ve pektinleri de içeren matriks bileşenleri Golgi aygıtında sentezlenerek salgılanır. Selüloz ise, bir plazma zarı enzim kompleksi olan **selüloz sentaz** tarafından sentezlenir (Şekil 15.9). Selüloz sentaz, sitozolde UDP-glikozdan selüloz sentezleyen bir transmembran enzimdir. Sentezlendikçe çoklu enzim alt birimleri tarafından oluşturulan bir gözenekten plazma zarı boyunca yer değiştiren selüloz zinciri, selüloz sentaz enzimine bağlı kalır. Benzer bir mekanizma, kitin ve bu bölümde daha sonra ele alınan bir ekstraselüler matriks bileşeni olan hiyalüronan sentezlemek için kullanılır.

Genleşen hücrelerde yeni sentezlenmiş selüloz mikrofibrilleri, hücrenin uzadığı yöne dik olarak toplanır ve bu daha sonraki hücre genleşme yönünü belirler. Uzayan hücrelerin duvarındaki selüloz mikrofibrilleri, ilginç şekilde, plazma zarının altını kaplayan kortikal mikrotübüllere paralel olarak yerleşir. Bu mikrotübüller, selüloz sentaz komplekslerinin zarda hareket yönünü belirlemek suretiyle, yeni sentezlenmiş selüloz mikrofibrillerinin



Şekil 15.9 Hücre uzaması sürecinde selüloz sentezi Selüloz sentazlar, UDP-glukozdan selüloz sentezleyen transmembran enzimlerdir. UDP-glukoz sitozolde selüloz sentaza bağlanır ve büyüyen selüloz zinciri hücrenin dışına doğru yer değiştirir. Selüloz sentaz kompleksleri, plazma zarının altında bulunan mikrotübülleri izler ve dolayısıyla yeni selüloz mikrofibrilleri hücre uzama yönüne dik açılarla yerleşirler.

Animasyon 15.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a15.1
Uzama Sırasında Selüloz Sentezi Bitkilerde hücre duvarı oluşumu selüloz zincirlerinin plazma zarındaki enzim kompleksleri tarafından sentezini gerektirir.



Şekil 15.10 Selüloz sentazın mikrotübüller ile ilişkisi Selüloz sentazın (yeşil floresan) mikrotübüller (kırmızı floresan) ile ilişkisi *Arabidopsis* sürgün hücrelerinde görüntülenmiştir. Selüloz sentazın ve mikrotübüllerin görüntüleri kolokalizasyonlarını göstermek için üst üste konarak birleştirilmiştir (From Paredez, A., A. Wright and D. W. Ehrhardt. 2006. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 574).

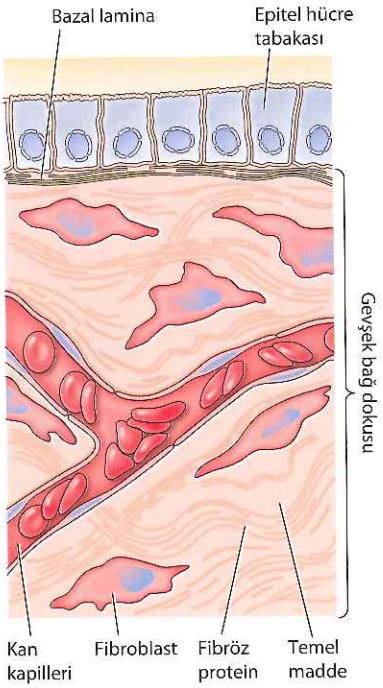
düzenini tanımlar (Şekil 15.10). Kortikal mikrotübüller, böylece, hücre duvarının büyüme yönünü belirtir ki bu da, daha sonra hücre genişleme yönünü ve nihayet bitkinin şeklini belirler. Bu durum, mikrotübül-ilişkili bir protein olan CLASP proteinindeki bir mutasyonun *Arabidopsis* büyümesi üzerindeki etkisi ile gösterilmektedir. CLASP, mikrotübüllerin artı uçlarına bağlanarak kararlılıklarını düzenler ve plazma zarını takip eder (13. bölümde ele alınmıştır). CLASP inaktivasyonu, hücre genişlemesini engelleyerek bitkilerin bodur kalmasına yol açar (Şekil 15.11).

Yapraklar, gövde, kökler ve çiçekler gibi farklı bitki dokularındaki hücre duvarları esas olarak selülozdan oluşur, fakat matriks bileşenleri ve selüloz ipliklerinin düzeni yönlerinden farklıdır. Bitki türleri 9 ila 18 farklı selüloz sentaz enzimi eksprese eder ve her plazma zarı enzim kompleksinin de en az üç farklı formu bulunmaktadır. Bu da hücre duvarlarının farklı dokularda çeşitli şekillerde düzenlenebilmelerine olanak sağlar.

Şekil 15.11 Mikrotübül-ilişkili bir proteindeki mutasyonun *Arabidopsis* büyümesi üzerindeki etkisi Soldaki bitki bir yabanıl tiptir. Sağdaki bitki ise mikrotübül-ilişkili protein CLASP'ta bir mutasyon taşımaktadır ve bu mutasyon normal hücre yayılmasını ve büyümesini engeller (Courtesy of Chris Amrose Universty of Saskatchewan).

Ekstraselüler Matriks ve Hücre-Matriks Etkileşimleri

Hayvan hücreleri hücre duvarlarıyla çevrili olmamalarına karşın, dokulardaki hayvan hücrelerinin çoğu, salgılanan hücreler arasındaki boşlukları dolduran ve hücreler ile dokuları birbirine bağlayan bir **ekstraselüler matriks** içerisine gömülmüştür. Çok çeşitli tipte salgılanan proteinden ve polisakkaridlerden oluşan ekstraselüler matriksin birkaç çeşidi vardır. Üzerine epitel hücre tabakalarının yerleştiği, önceleri taban zarlar olarak adlandırılan, ince, levhamsı **bazal lamina** bir ekstraselüler matriks tipi örneğidir (Şekil 15.12). Epitel hücre tabakalarına destek olmasının yanı

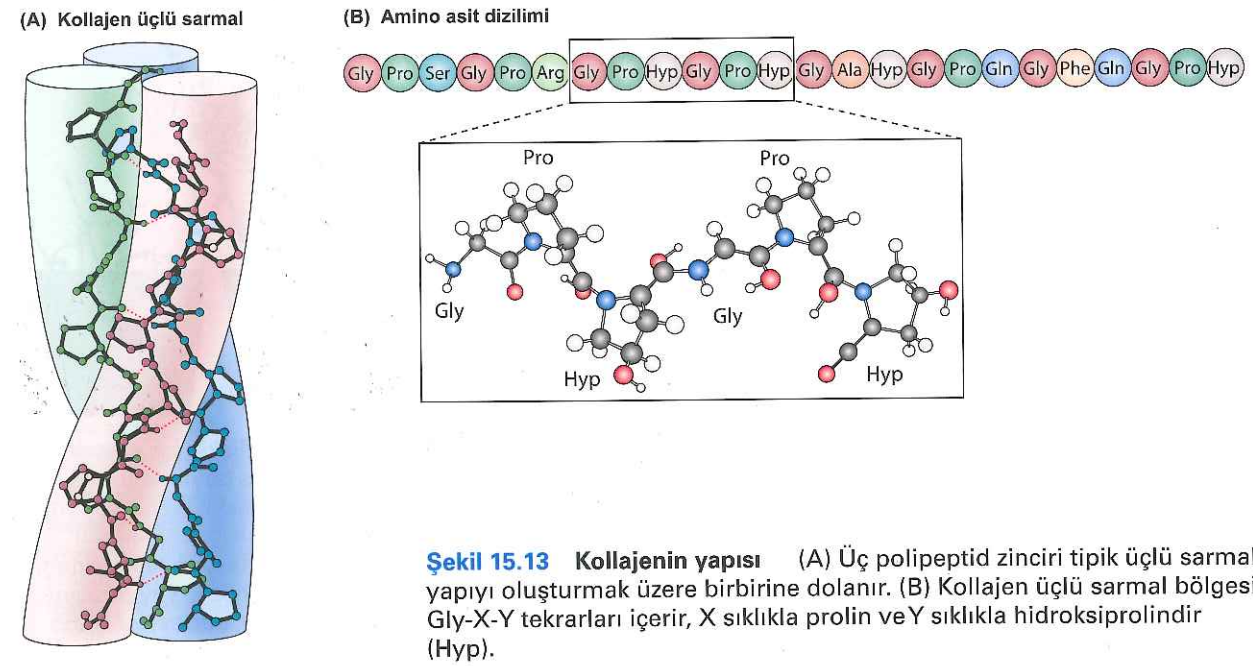


Şekil 15.12 Ekstraselüler matriks örnekleri Epitel hücre tabakaları, bazal lamina denilen ince bir ekstraselüler matriks üzerine yerleşirler. Bazal laminanın altında, büyük kısmı fibroblastların salgıladığı ekstraselüler matriksten oluşan, gevşek bağ dokusu bulunur. Ekstraselüler matriks, jel-benzeri polisakkarid temel maddesi içerisine gömülmüş, ipliksi, yapısal proteinler içerir.

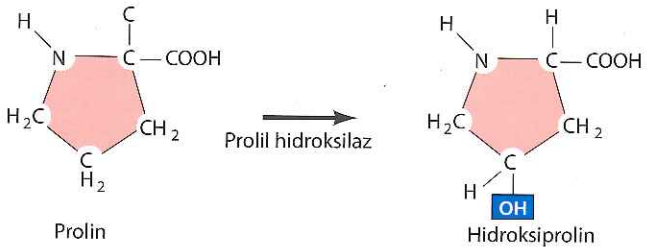
sıra, bazal lamina kas hücrelerini, adipoz (yağ) hücrelerini ve periferal sinirleri çevreler. Ancak, ekstraselüler matriks, en fazla, bağ dokularda bulunur. Örneğin, epitel hücre tabakaları altında bulunan gevşek bağ dokusu esas olarak, içerisinde fibroblastların dağınık olarak bulunduğu bir ekstraselüler matriksten ibarettir. Kemik, tendon ve kıkırdak gibi diğer bağ dokusu tipleri de benzer şekilde, yapı ve işlevlerinde öncelikli sorumluluğu olan ekstraselüler matriksten oluşur. Ekstraselüler matrikste bulunan proteinlerin ve polisakkaridlerin birkaçı aynı zamanda plazma zarında da yakın ilişkili olarak bulunur ve burada glikokaliks adı verilen polisakkarid bakımından zengin bir örtü oluşturur (bkz. Şekil 14.11).

Matriks yapısal proteinleri

Ekstraselüler matriksler, temel olarak bitki hücre duvarlarındaki desene benzer şekilde, jel-benzeri polisakkarid temel maddesi içerisine gömülmüş, güçlü ipliksi proteinlerden meydana gelmiştir. Ekstraselüler matriks, ipliksi yapısal proteinlere ve polisakkaridlere ek olarak, matriks bileşenlerini birbirine ve bitişik hücrelere bağlayan adhezyon proteinleri de içerir. Değişik ekstraselüler matriks tipleri arasındaki farklılıklar, hem bu farklı bileşenlerin çeşit ve miktarlarındaki nicel değişimlerden hem de bunların düzenlenmesindeki değişikliklerden kaynaklanır. Örneğin, tendonlar yüksek oranlarda ipliksi proteinlere sahipken kıkırdakta baskıya-dirençli katı bir jel oluşturan polisakkaridler yüksek konsantrasyonda bulunur. Kalsiyum fosfat kristallerinin birikmesi nedeniyle kemikte ekstraselüler matriks serttir. Bazal laminanın tabaka şeklinde yapılanma nedeni de, bu yapının bağ dokudakinden farklı matriks bileşimine sahip olmasıdır.



Şekil 15.13 Kollajenin yapısı (A) Üç polipeptid zinciri tipik üçlü sarmal yapıyı oluşturmak üzere birbirine dolanır. (B) Kollajen üçlü sarmal bölgesi Gly-X-Y tekrarları içerir, X sıklıkla prolin ve Y sıklıkla hidroksiprolindir (Hyp).



Şekil 15.14 Hidroksiprolin oluşumu Prolil hidroksilaz kollajendeki prolinleri hidroksiproline dönüştürür.

Ekstraselüler matriksin en önemli yapısal proteini, hayvan dokularında en bol bulunan tek protein olan **kollajendir** (Şekil 15.13). Kollajenler, en az 40 farklı üyesi bulunan büyük bir protein ailesidir. Üç polipeptid zincirinin, halata benzer bir yapı oluşturmak üzere birbirlerine sıkıca dolandığı üçlü sarmal yapılarıyla karakterizedirler. Kollajenlerin üçlü sarmal bölgelerinde Gly-X-Y amino asit dizisi tekrarları bulunur. Polipeptid zincirlerinin, kollajen üçlü sarmalı oluşturmak üzere, yeterince yakın paketlenebilmesi için her üç amino asitte bir glisin (sadece hidrojenden ibaret bir yan dalı bulunan, en küçük amino asit) bulunması gerekir. X pozisyonunda sıklıkla prolin ve Y pozisyonunda da hidroksiprolin yer alır çünkü halka yapıları nedeniyle bu amino asitler polipeptid zincirlerinin sarmal düzenini sağlamlaştırırlar.

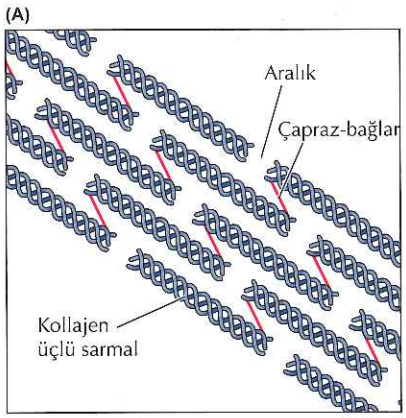
Bilgi İçin

Prolinin kollajende bulunan hidroksiproline dönüşümünü katalizleyen enzim olan prolil hidroksilazın aktivitesi için C vitamini gereklidir. C vitamini eksikliği, zayıflamış bağ doku nedeniyle ortaya çıkan deri lezyonları ve kan damarlarının kanaması ile tanımlanan iskorbüt hastalığına yol açar.

Ender görülen hidroksiprolin amino asiti, önceden kollajen polipeptid zincirinin yapısına girmiş olan prolinlerin endoplazmik retikulumda modifikasyonu ile oluşturulur (Şekil 15.14). Kollajende bulunan lizin amino asitleri de genellikle hidroksilizine çevrilir. Bu değiştirilmiş amino asitlerin hidroksil gruplarının, polipeptid zincirleri arasında hidrojen bağı oluşturarak, üçlü sarmalın dayanıklılığını artırdıkları düşünülmektedir. Hidroksiprolinin bitki duvarındaki bazı glikoproteinlerin yapısında da sıklıkla görülmesine karşın, bu amino asitler diğer proteinlerde nadiren bulunur. Çeşitli ekstraselüler matriks tiplerinde farklı rollere sahip 28 farklı kollajen tipi vardır (Tablo 15.1). En bol bulunan kollajen tipi (tip I kollajen), bağ dokularının temel yapısal bileşeni olan fibril oluşturan kollajenlerden biridir. Bu kollajenlerin polipeptid zincirleri, yaklaşık olarak1000 amino asit ya da 330 Gly-X-Y tekrarı içerir. Bu kollajenler, hücreden salgılandıktan sonra, üçlü sarmal

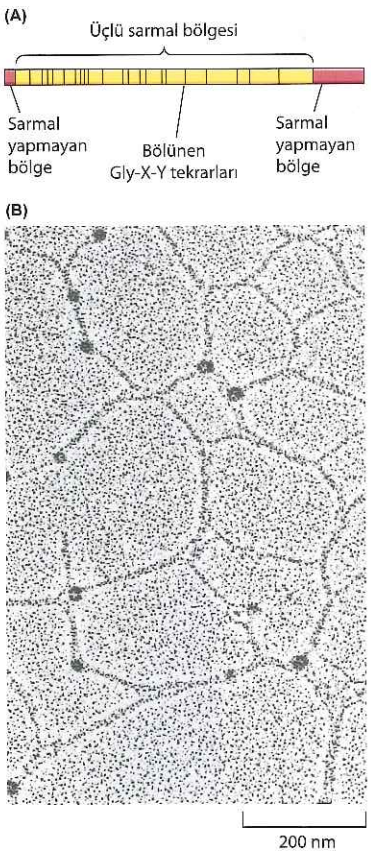
Tablo 15.1 Kollajen Ailesinin Temsili Üyeleri

Kollajen sınıfı	Tipler	Rol
Lif-oluşturan	I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII	Deri, kemik ve kıkırdak dahil çoğu bağ dokuda liflerin oluşumu
Ağ-oluşturan	IV	Bazal laminanın oluşumu
Lif-ilişkili	IX,XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXVI	Kollajen fibrillerin diğer ekstraselüler bileşenlerle ilişkisi
Sabitleyici	VII	Bazal laminanın altındaki bağ dokuya tutunması
Transmembran	XIII, XVII, XXIII	Transmembran birimlerine sahip hücre yüzey molekülleri



moleküllerin düzenli, aralıklı diziler halinde bir araya geldiği, **kollajen fibrillerini** oluşturur (Şekil 15.15). Hücre içerisinde bu fibriller oluşmaz çünkü fibril oluşturacak olan kollajenler, polipeptid zincirinin her iki ucunda sarmal yapmayan kısımları bulunan, çözünür öncü moleküller **(prokollajen)** halinde sentezlenir. Prokollajen salgılandıktan sonra kollajen oluşturmak üzere kesilir, bu nedenle, kollajenin fibriller halinde birleşmesi sadece hücre dışında gerçekleşir. Kollajen moleküllerinin oluşturduğu fibriller, lizin ve hidroksilizin moleküllerinin yan zincirleri arasında kovalent çapraz bağlantıların oluşmasıyla daha da güçlenir. Sıklıkla, fibriller bir araya gelerek, çapları birkaç mikrona ulaşabilen kollajen lifleri oluşturur.

Şekil 15.15 Kollajen fibriller (A) Kollajen molekülleri fibrilleri oluşturmak üzere, düzenli yalpalayan bir dizilimde bir araya gelir. Moleküller boylarının dörtte biri oranında birbirleri ile çakışır ve bir molekülün N ucu ile diğerinin C ucu arasında kısa bir aralık bulunur. Bu topluluk, özellikle, moleküllerin ucundaki lizin ve hidroksilizin yan zincirleri arasındaki kovalent çapraz-bağlar ile güçlendirilir. (B) Kollajen fibrillere ait elektron mikrograf. Kollajen moleküllerinin yalpalar düzeni ve aralarındaki açıklık, fibrilerdeki tipik çapraz-çizgilerin nedenidir.



Bağ dokuları, fibril- oluşturan kollajenlere ek olarak, kollajen fibrillerin yüzeyine bağlanarak onları birbirine veya diğer matriks bileşenlerine tutturan, fibril-bağlantılı kollajenler içerir (Bkz.Tablo15.1). Bazal lamina, bir ağ-oluşturan kollajen olan tip IV kollajenden oluşmuştur (Şekil 15.16). Tip IV kollajendeki Gly-X-Y tekrarları sıklıkla kısa, sarmal yapmayan dizilerle bölünmüştür. Bu bölünmeler nedeniyle, tip IV kollajen fibril-oluşturan kollajenlere kıyasla daha esnektir. Sonuç olarak, fibril yerine, iki boyutlu ve çapraz bağlantılı bir ağ halinde bir araya gelir. Bir başka kollajen tipi, bazı bazal laminaları alttaki bağ dokuya bağlayan sabitleme fibrillerini oluştururken bazı kollajenler hücre-matriks etkileşimlerine katılan transmembran proteinleridir.

Bağ dokuları, düzenli olarak genleşip tekrar başlangıçtaki biçimine dönen

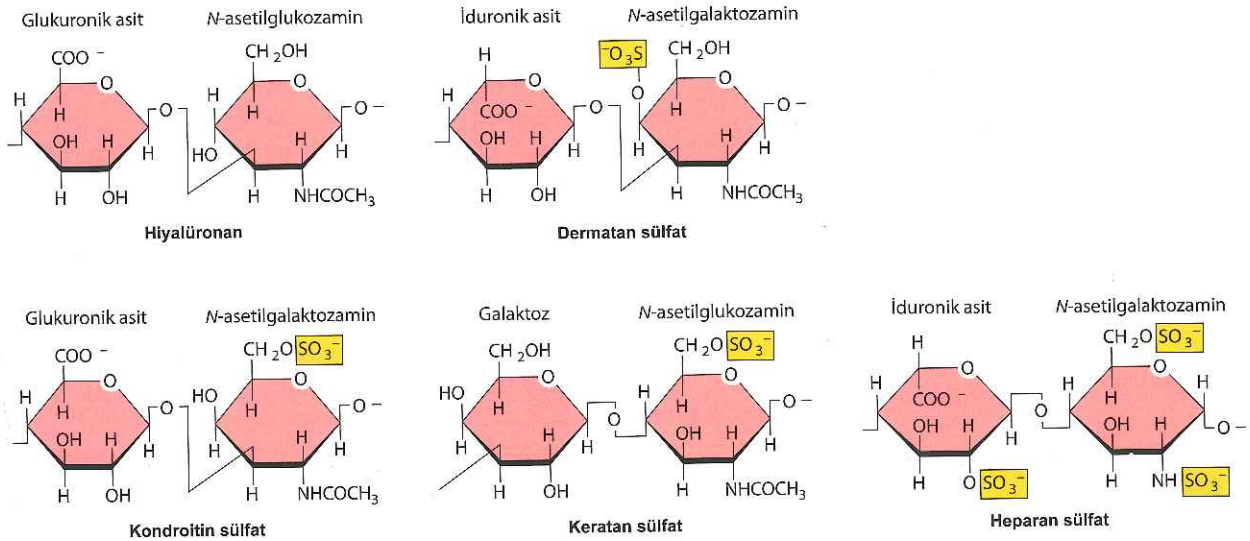
Şekil 15.16 Tip IV kollajen (A)Tip IV kollajenin (sarı) Gly-X-Y tekrarlı yapısı çoklu helezonik olmayan diziler (çubuklar) tarafından bölünmüştür. (B) Bir tip IV kollajen ağının elektron mikrografı (B, P. D.Yurchenco and J.C. Schittny, 1990. *FASEB J.* 4: 1577.)

organlarda özellikle bol miktarda bulunan **elastik liflere** de sahiptir. Örneğin; akciğerler her nefes alışta genişler ve her nefes verişte başlangıç şekline geri döner. Elastin lifler esas olarak, lizin moleküllerinin yan zincirleri arasında oluşan kovalent bağlarla çapraz bağlantılı bir ağ oluşturan **elastin** proteininden meydana gelmiştir (kollajendekine benzer şekilde). Bu çapraz bağlı elastin zincirleri ağı, gerildiğinde genişleyen ve bırakılınca eski haline dönen bir lastik bant gibi davranır.

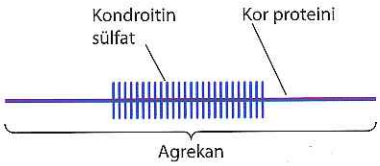
Matriks polisakkaridleri

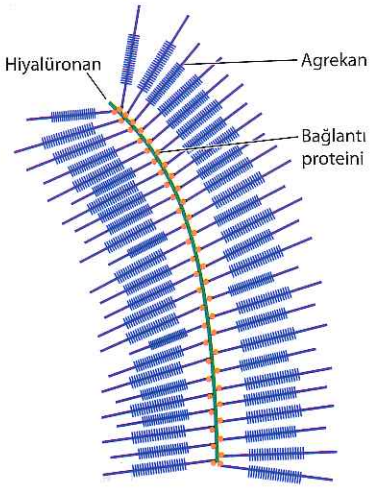
Ekstraselüler matriksin ipliksi yapılı proteinleri, tekrarlayan disakkarid birimlerinden meydana gelen ve **glikozaminoglikanlar (GAG'lar)** denilen polisakkaridlerden oluşan jeller içerisine gömülmüştür (**Şekil 15.17**). Disakkaridin şekerlerinden biri ya *N*-asetilglukozamin ya da *N*-asetilgalaktozamindir ve ikincisi genellikle asidiktir (glukronik asit veya iduronik asit). Hiyalüronan hariç bu şekerler, sülfat grubu eklenerek modifiye edilmiştir. Bu nedenle GAG'lar yüksek oranda negatif yüklüdür. Bitki hücresi duvarlarındaki pektinler gibi, pozitif yüklü iyonları bağlayarak su moleküllerini tutar ve sulu jel oluşturur, böylece ekstraselüler matrikse mekanik destek sağlar. Yaygın sülfatlanmış GAG'lar arasında dermatan sülfat, kondroitin sülfat, keratan sülfat ve heparan sülfat bulunmaktadır.

Hiyalüronan, tek bir uzun polisakkarid zinciri halinde bulun tek GAG'dır. Hiyalüronan da, selüloz ve kitin gibi, plazma zarında transmembran hiyalüronan sentaz tarafından sentezlenir. Tüm diğer GAG'lar, ağırlıklarının %95'ine kadar polisakkarit bulundurabilen **proteoglikanları** oluşturmak üzere, proteinlere bağlanır. Proteoglikanlar, bir kor proteinin serin birimlerine tutunmuş, en az bir olmak üzere yüzden fazla GAG zinciri içerebilir. Çeşitli kor proteinlerinin (10 ile >500 kd aralığında) tanımlanmış olması, proteoglikanların çeşitlenmiş bir makromolekül grubu olduğunu belirtir. Ekstraselüler matriks bileşeni



Şekil 15.17 Ana glikozaminoglikan tipleri Glikozaminoglikanlar (GAG) tekrarlayan disakkarid birimlerinden oluşur. Hiyalüronan dışındaki şekerler genellikle sülfat içerir.





Şekil 15.18 Agrekan ve hiyalüronan kompleksleri Agrekan, bir kor proteine bağlanmış yüzden fazla kondroitin sülfat zincirinden oluşan büyük bir proteoglikandır. Kıkırdağın ekstraselüler matriksinde, çok sayıda agrekan molekülü uzun hiyalüronan zincirlerine bağlanarak büyük kompleksler oluşturur. Bu birleşim, bağlantı proteinleriyle sabitlenir.

olmalarının yanı sıra, sindekanlar (transmembran alfa sarmalına sahip) ve glipikanlar (GPI bağlayıcısına sahip) gibi bazı proteoglikanlar, hücre-hücre ve hücre-matriks adhezyonunda integrinlerle birlikte işlev gören yüzey proteinleridir.

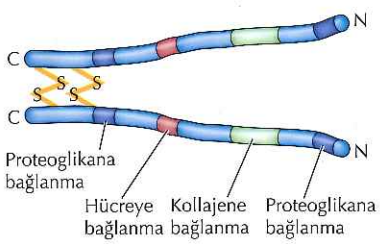
Bir miktar proteoglikan, ekstraselüler matrikste büyük kompleksler oluşturmak üzere hiyalüronan ile ilişkiye girer. İyi tanımlanmış bir örnek, kıkırdağın temel proteoglikanı olan agrekandır (**Şekil 15.18**). Yüzden fazla kondroitin sülfat zinciri, 250 kd civarında bir kor proteinine tutunarak yaklaşık 3000 kd büyüklükte bir proteoglikan oluşturur. Çok sayıda agrekan molekülü daha sonra hiyalüronan zincirleriyle bağlanarak, kollajen ağı içerisine hapsedilen büyük kümeler (>100,000 kd) oluşturur. Proteoglikanlar ayrıca, kollajenler ve diğer matriks proteinleriyle de etkileşerek, ekstraselüler matriksteki ipliksi yapısal proteinlerin içine yerleştiği jelimsi ağlar oluşturur. Örneğin; perlekan (bazal laminanın en önemli heparan sülfat proteoglikanı), az sonra tartışılacağı gibi, hem tip IV kollajene hem de adhezyon proteini laminine bağlanır.

Adhezyon proteinleri

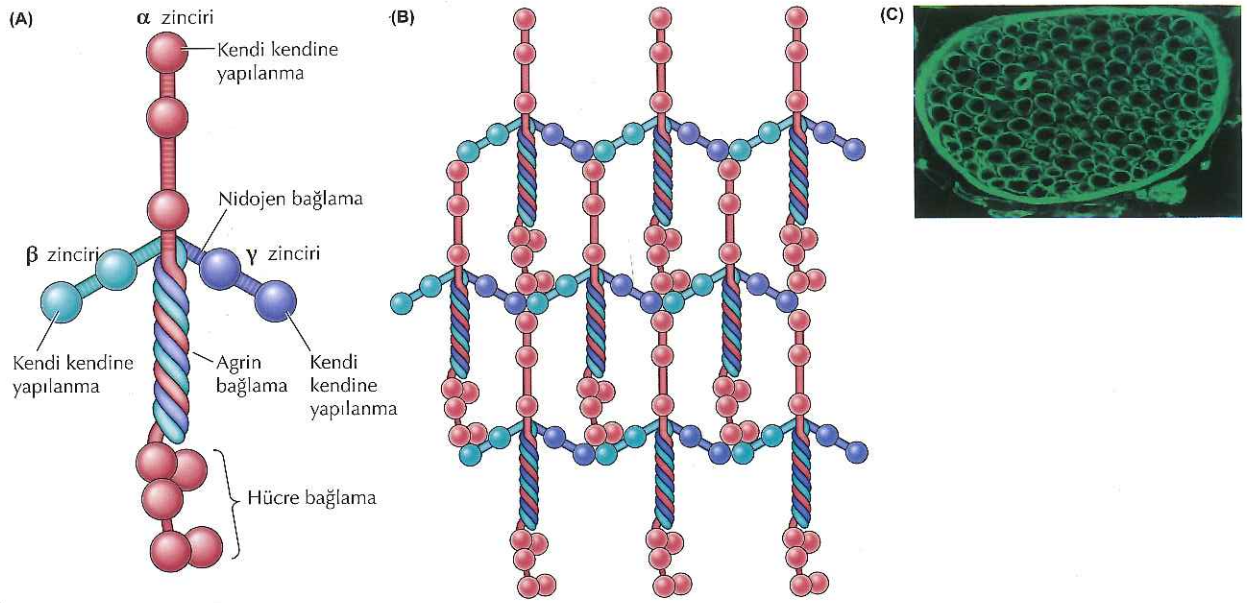
Ekstraselüler matriks öğelerinden üçüncü grubu oluşturan adhezyon molekülleri, matriks bileşenlerinin birbirlerine ve hücrelerin yüzeylerine tutunmasından sorumludur. Kollajen ve proteoglikanlar ile etkileşerek matriks organizasyonunu belirler ve integrinler (bir sonraki kısımda tartışılacak olan) gibi yüzey reseptörleri için ana bağlanma noktaları oluşturur.

Bu moleküllerin prototipi, bağ dokularının temel adhezyon molekülü olan **fibronektindir**. Fibronektin, her biri 2500 kadar amino asit içeren iki polipeptid zincirinden oluşan bir dimerik glikoproteindir (**Şekil 15.19**). Ekstraselüler matrikste fibronektin fibriller ile çapraz bağlıdır. Fibronektin, hem kollajen hem de GAG'lar için bağlanma bölgelerine sahip olduğundan bu matriks bileşenlerini birbirine çapraz bağlar. Fibronektin molekülü üzerindeki belirgin bir alan integrinler tarafından tanınır. Fibronektin proteinleri dokudan dokuya büyük farklılıklar gösterir ancak hepsi tek bir genin mRNA'sının değişik şekillerde kırpılması ile oluşmuştur.

Bazal laminanın temel bileşenleri, bazal laminayı bir araya getirmede temel düzenleyiciler olan, **laminin** ailesinden farklı adhezyon molekülleridir (**Şekil 15.20**). Lamininler çapraz ya da T-şeklinde α, β ve γ altbirimlerinden oluşan trimerler olup bunlar beş α, dört β ve üç γ geninin ürünleridir. Lamininler, tip IV kollajene benzer şekilde, tel örgüye benzer şekilde birbirleriyle bağ oluşturur. Farklı laminin birimleri ayrıca hücre yüzeyi reseptörleri (örn., integrinler)



Şekil 15.19 Fibronektin yapısı Fibronektin, benzer polipeptid zincirlerinin C uçlarına yakın bir bölgeden disülfid bağlarıyla bağlanmasıyla oluşan bir dimerdir. Proteoglikanlara, hücrelere ve kollajene bağlanma bölgeleri belirtilmiştir. Molekül, burada gösterilmeyen ek bağlanma bölgelerine de sahiptir.

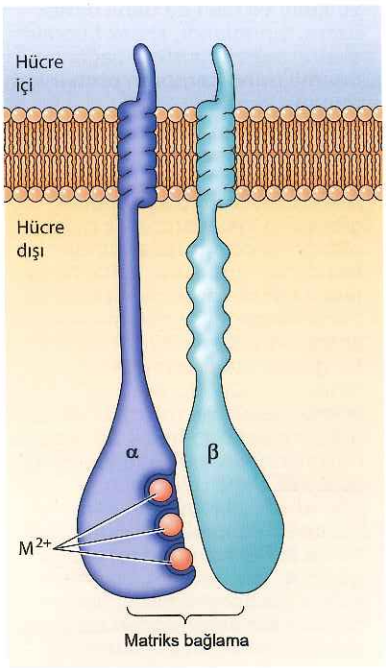


Şekil 15.20 Lamininler Lamininler α, β ve γ olmak üzere üç polisakkarid zincirine sahiptir. Her bir polipeptid, küresel birimler arasına serpiştirilmiş çubuk-benzeri birimlere sahiptir. Polipeptid zincirleri çubuk-benzeri birimlerden oluşan bir üçlü sarmal bölgesi ile bağlantılıdır. Bazı nidojen, agrin (bir proteoglikan) ve hücre yüzeyi reseptörleri bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. (B) Bir siniri çevreleyen bazal laminada yer alan laminin ağı. (C) Bir siniri çevreleyen bazal laminadaki laminin ağı, laminin beta zincirine karşı floresan antikor ile boyanmış (Durbeej, M. 2010. *Cell Tissue Res.* 339; 262)

ve proteoglikanlar için bağlanma bölgelerine sahiptir. Lamininler ayrıca bir diğer adhezyon proteini olan ve yine tip IV kollajene bağlanan **nidojen** ile sıkıca ilişkilidir. Bu çoklu ilişkilerin sonucu olarak, laminin, nidojen, kollajen ve proteoglikanlar bazal laminada çapraz bağlı ağlar oluşturur. Farklı laminin trimerleri dokuya özgü dağılımlar gösterdiği için laminin genlerindeki mutasyonların, bir tür kas distrofisini de içeren çok sayıda insan kalıtsal hastalığının altında yatan neden olması şaşırtıcı değildir.

Hücre-matriks etkileşimleri

Hücrelerin, ekstraselüler matrikse tutunmalarından sorumlu başlıca hücre yüzey reseptörleri **integrinlerdir**. İntegrinler, α ve β ile simgelenen iki alt birimden oluşan, transmembran proteinler ailesidir (Şekil 15.21). 18 α ve 8 β alt biriminin kombinasyonlarından oluşan, 24 farklı integrin bulunmaktadır. İntegrinler, kollajen, fibronektin ve laminin gibi ekstraselüler matriksin bir çok bileşeninde bulunan, kısa amino asit dizilerine bağlanır. İlk olarak



Şekil 15.21 İntegrinlerin yapısı İntegrinler, α ve β olarak adlandırılan iki transmembran alt biriminin heterodimerleridir. α alt birimi M^{2+} adlı divalent katyonlara bağlanır. Matriks-bağlanma bölgesi her iki alt birimin de kısımlarını içerir.

Anahtar Deney

İntegrinin Karakterizasyonu

Structure of Integrin, a Glycoprotein Involved in the Transmembrane Linkage between Fibronectin and Actin

John W. Tamkun, Douglas W. DeSimone, Deborah Fonda, Ramila S. Patel, Clayton Buck, Alan F. Horwitz and Richard O. Hynes
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA (JWT, DWD, DF, RSP, and ROH), The Wistar Institute, Philadelphia (CB), and The University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia (AFH)

Cell, Volume 46, 1986, pages 271-282

Bağlam

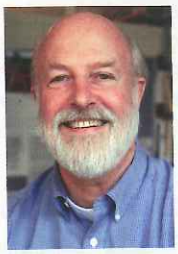
Hücrenin ekstraselüler matrikse adhezyonu hücre biyologlarının ilgisini çekmektedir çünkü matrikse adhezyon kanser hücrelerinde azalmış olup, bu azalma olasılıkla hücrelerin anormal büyümeleriyle ve metastaz ya da vücut içine yayılma yetenekleriyle ilişkilendirilmiştir.1970'lerin sonunda ve 1980'lerin başında, Richard Hynes'inki dahil farklı laboratuvarların çalışmaları, aktin hücre iskeletinin stres lifleri ile ekstraselüler matriksteki fibronektin arasında fiziksel bir bağ bulunduğunu tespit etti.Bu bağı oluşturan hücre iskeleti proteinleri, vinkulin ve talin de dahil olmak üzere, tanımlandı, ancak hücreleri ekstraselüler matrikse bağlayan önemli transmembran proteinleri tanımlanamadı.

Hücrenin ekstraselüler matrikse adhezyonunda rol alan transmembran protein adayları, Alan Horwitz ve Clayton Buck gibi bilim insanlarının da dahil olduğu birçok grup tarafından hazırlanan antikorlar kullanılarak tespit edildi. Bu antikorlar, transmembran proteinler olduğu anlaşılan 140-kd büyüklüğünde bir glikoprotein kompleksini tanıdı. İmmünofloresan ve immünoelektron mikroskopisi, bu glikoproteinlerin hücre adhezyon noktalarından matrikse yerleştiğini gösterdi. İlave çalışmalar, 140 kd'luk glikoproteinlerin fibronektine bağlı olduğunu ve hücre adhezyonunda rol aldığını gösterdi. Bu nedenle, bu 140 kd'luk glikoproteinlerin, hücre-matriks adhezyonundan sorumlu olan transmembran proteinler için muhtemel adaylar olduğu ortaya çıktı.Tamkun ve diğerleri tarafından tanımlanan deneylerde, bu antikorlar, bu glikoproteinlerden birini kodlayan bir moleküler klonu izole etmek için kullanıldı ve böylece integrinin ilk moleküler karakterizasyonu sağlandı.

Deneyler

140 kd'luk glikoproteinlerin birini kodlayan bir moleküler klon izole etmek için,Tamkun ve diğerleri, tavuk embriyo fibroblastlarının mRNA'sından bir cDNA kütüphanesi hazırlamıştır. Bu cDNA kütüphanesi, *E. coli*'de ökaryotik cDNA'nın yüksek düzeyde transkripsiyonunu ve translasyonunu sağlayan bir bakteriyofaj λ ekspresyon vektöründe hazırlanmıştır (bkz. Şekil 4.21). cDNA kütüphanesi, yaklaşık 100,000 bağımsız cDNA inserti içermekte olup, bu insertler elde edildiği tavuk embriyo fibroblastlarında ifade edilen tüm mRNA'ların klonlarını temsil etmek için yeterlidir. Kütüphane,daha sonra,ilgili cDNA'ları taşıyan bu rekombinant fajları belirlemek için 140 kd'luk glikoproteinleri tanıyan antikorlar ile tarandı. Her bir rekombinant fajın ürettiği plaklar, tıpkı nükleik asit hibridizasyonu ile bir kütüphanenin taranması için yapıldığı gibi, nitroselüloz filtrelere transfer edildi (bkz. Şekil 4.25). Bununla birlikte, ekspresyon kütüphanesinin taraması için, filtreler istenen proteini eksprese eden klonları tanımlamak için bir antikor ile incelendi. Bu tür bir antikor taraması ile,Tamkun ve diğerleri,140 kd'luk glikoproteinlere karşı olan antikorlar tarafından tanınan proteinleri ifade eden birçok rekombinant klonu başarılı bir şekilde tanımlamışlardır.

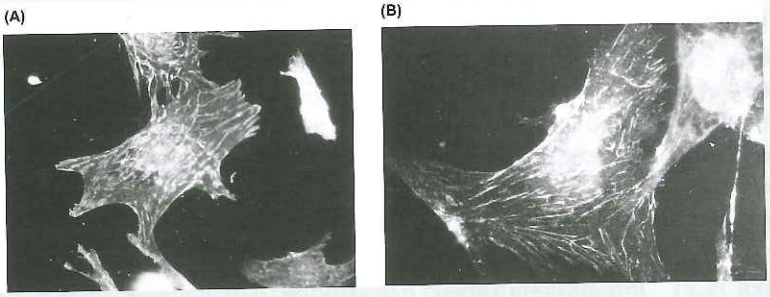
Çözmeleri gereken bir sonraki



Richard O. Hynes

sorun, klonlanmış cDNA'ların 140 kd'luk glikoproteinlerin birini mi, yoksa daha fazlasını mı kodladığının saptanması idi. Bunu yapmak için, klonlanmış proteinlerin tanıdığı antikorları saflaştırma amacıyla klonlardan eksprese edilen proteinleri kullandılar. Buna ek olarak, özel olarak klonlanmış cDNA'lar tarafından kodlanan proteinlere karşı yöneltilen yeni antikorları üretmek için tavşanlara klonlanmış proteinleri enjekte ettiler. Elde edilen antikorlar, tavuk embriyo fibroblastlarında yapılan immünoblotlama analizlerinde,140 kd kompleksinin proteinlerinden birini tanıyarak, klonlanmış cDNA'lar ile bu protein arasında bir ilişki kurdu. Buna ek olarak, klonlanmış proteinlere karşı olan antikorlar, immünofloresan analizlerindeki orijinal antikorda olduğu gibi hücreleri boyadı ve stres liflerinin ekstraselüler matrikse tutunma bölgelerine karşılık gelen bir boyanma paterni ortaya çıkardı (şekillere bakınız). Gerek immünoblotlama gerekse immünofloresan sonuçları, klonlanan cDNA'ların 140 kd'luk glikoprotein kompleksi proteinlerinden birini kodladığını gösterdi.

Daha sonra dizilenen cDNA'nın 803 amino asit içeren bir proteini



Tavuk embriyosu fibroblastlarının boyanması (A)140-kd glikoprotein kompleksine karşı orijinal antiserum ile veya (B) cDNA klonlarından eksprese olan proteine karşı saflaştırılmış antikorlar ile.

Anahtar Deney

kodladığı bulundu. Protein bir amino ucu sinyal dizisi ve karboksi ucunda 23 hidrofobik amino asitten oluşan görünür bir transmembran α helezonu içeriyordu. Dizi, kısa bir sitozolik bölge ile tahmin edilen transmembran glikoproptein yapısı ile tutarlı bir şekilde çoklu glikolizasyon bölgeleri içeren büyük bir ekstraselüler bölgeyi öngörüyordu.

Etki

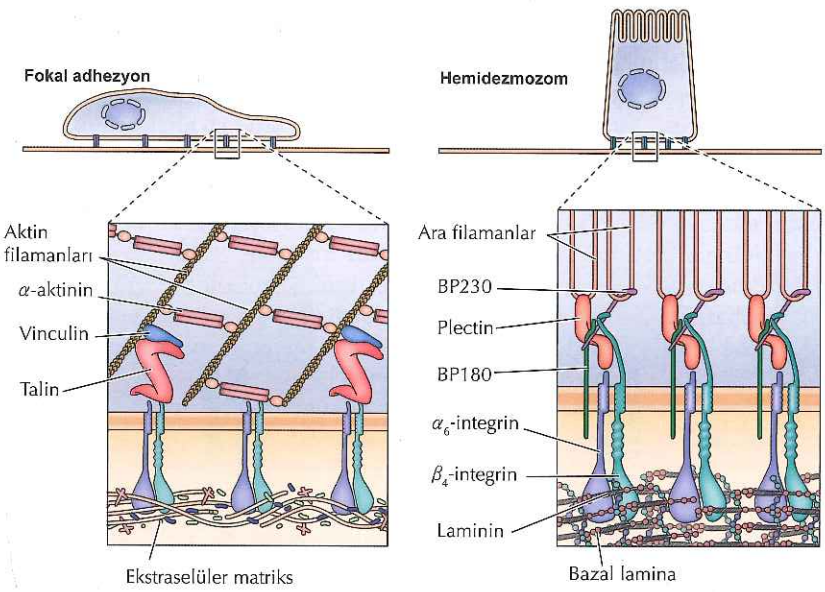
Hynes ve meslektaşları, ekstraselüler matriksteki fibronektini hücre iskeletine bağlamada görev alan bir transmembran protein kodlayan bir cDNA klonlamış oldukları sonucuna vardılar. Proteini, "ekstraselüler matriks ile hücre iskeleti arasındaki transmembran ilişki ile bağlantılı ayrılmaz bir zar kompleksi" olarak rolünü belirtmek için integrin olarak adlandırdılar. İntegrinin ilk kez klonlanması, kararlı hücre bağlantılarının moleküler temelinin günümüzde kabul gören şekilde anlaşılmasını sağlamıştır. Fokal adhezyonlarda, integrinler aktin filamanları ekstraselüler matrikse bağlar. Ayrıca, integrinler epitel hücrelerin ekstraselüler matrikse hemidezmosomlarda tutunmalarını sağlayarak buralarda ekstraselüler matriksi ara filamanlara bağlar. Dolayısıyla, Hynes ve meslektaşlarının ileri sürdüğü gibi, integrinler hücre-matriks adhezyonunda genel bir rol oynar. Bunu izleyen çalışmalar, integrinlerin hücrelerde sinyal iletim kompleksleri olarak da önemli bir rol aldığını ve hücre dışından gelen sinyalleri aktararak hücre hareketi, proliferasyonu ve hayatta kalma gibi bir çok bakımdan hücreyi kontrol ettiğini göstermiştir (16. bölümde tartışılmıştır). Bu nedenle, integrinlerin karakterizasyonu, yalnızca hücrenin matrikse tutunmasının doğasını anlamaya değil aynı zamanda hücre davranışını düzenleyen yeni sinyal iletim mekanizmalarını aydınlatmaya da bir kapı açmıştır.

tanımlanan integrin-bağlanma dizisi, fibronektinde bulunan ve integrin ailesinin birkaç üyesi tarafından tanınan Arg-Gly-Asp dizisidir. Bununla birlikte, diğer integrinler, kollajenlerdeki, laminindeki ve pek çok farklı proteoglikandaki tanınma dizileri gibi farklı peptid dizilerine bağlanır. Çeşitli hücrelerin yüzeyindeki transmembran proteoglikanlar da, ekstraselüler matriks bileşenlerine bağlanarak hücre-matriks etkileşimlerini düzenler.

Hücreleri ekstraselüler matrikse bağlamalarının yanı sıra, integrinler, hücre iskeleti için çapa görevi yapar (Şekil 15.22). Hücre iskeletinin, bu şekilde ekstraselüler matrikse bağlanması, hücre-matriks bağlantılarının

Bilgi İçin

Yılan zehirleri, disintegrin adı verilen ve integrinlere bağlanarak onların ekstraselüler matriksteki proteinlere bağlanmasını engelleyen proteinler içerir. Hücreler ile ekstraselüler matriks arasındaki bu bağlantıların bozulması, yılanların avlarını sıvılaştırmalarına yardım eder.



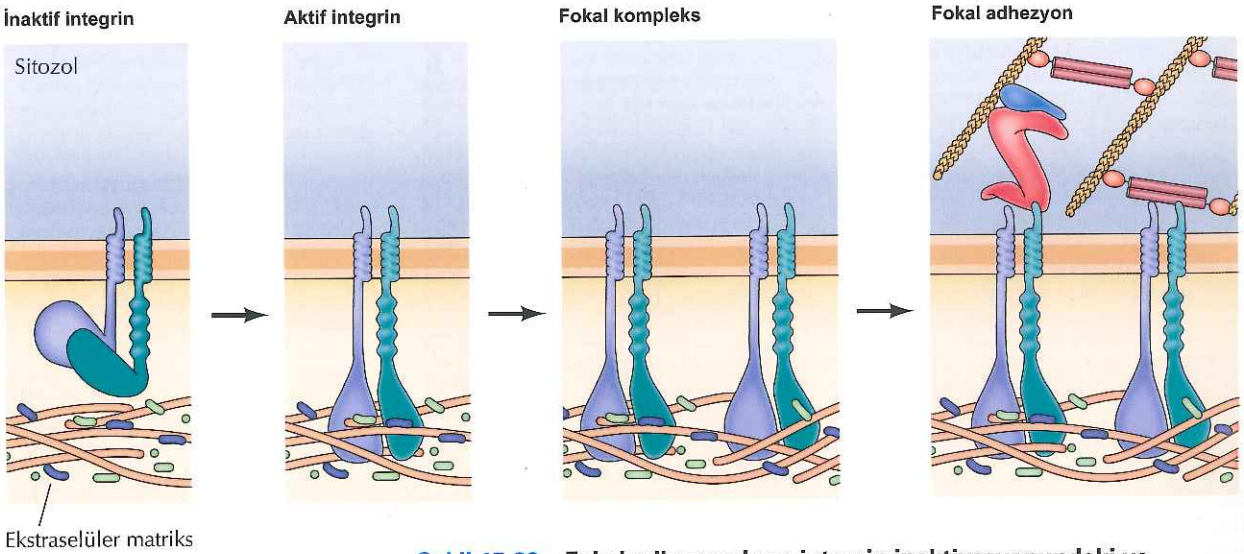
Şekil 15.22 İntegrinlerin aracılık ettiği hücre-matriks bağlantıları
İntegrinler, hücre iskeletini ekstraselüler matrikse bağlayan iki tip kararlı bağlantıya aracılık eder. Fokal adhezyonlarda aktin filaman demetleri, α-aktinin, talin ve vinkulin gibi diğer bazı moleküller aracılığıyla, integrinlerin β alt birimlerine tutunur. Hemidezmozomlar da, $\alpha_6\beta_4$ integrinler ekstraselüler matriksin bazal lamina tabakasını plektin aracılığıyla ara filamanlara bağlar. BP180 ve BP230 hemidezmozom oluşumunda ve kararlılığında rol oynar.

Video 15.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v15.1
Fokal Adhezyonlar Fokal adhezyonlar, ekstraselüler matriks ile etkileşen hücre arasında mekanik kuvvet ve düzenleyici sinyallerin iletildiği büyük protein kompleksleridir.

Video 15.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v15.2
Fokal Adhezyon Dinamikleri Fokal adhezyonların dinamik oluşumu ve parçalara ayrılması hücre göçünde merkezi bir rol oynar.

sağlamlığından sorumludur. İntegrinler ile hücre iskeleti arasında belirgin bağlantılar, iki tip hücre-matriks bağlantısında, Bölüm 13'te tartışılan **fokal adhezyonlar** ve **hemidezmozomlarda** bulunur. Fokal adhezyonlar, fibroblastlar gibi çeşitli hücreleri ekstraselüler matrikse bağlar. Fokal adhezyonlarda integrinlerin β alt birimlerinin sitoplazmik bölümleri, aktine bağlanan proteinler (α-aktinin, vinkulin ve talin gibi) aracılığıyla aktin filaman demetlerine bağlanarak, hücre aktin iskeletine tutunur. Hemidezmozomlar, özgül bir integrinin ($\alpha_6\beta_4$ olarak tanımlanır) plektin aracılığıyla, aktinle değil ara filamanlarla birleştiği, epitel hücre bağlantılarına aracılık eder. Bu β_4 integrin alt biriminin uzun sitoplazmik kuyruğu tarafından yönlendirilir. $\alpha_6\beta_4$ aynı zamanda laminine bağlanır ve böylece, hemidezmozomlar epitel hücreleri bazal laminaya sabitler.

İntegrin aktivitesindeki kontrollü değişiklikler, hücre hareketi sırasında fokal adhezyonların hızla oluşmasının ve dağılmasının nedenidir (bkz. Şekil 13.20). İntegrinlerin tersinir şekilde matriks bileşenlerine bağlanma becerisi onların inaktif ve aktif durumları arasında konformasyon değişikliği yapabilme yeteneğine dayanır ve bu ya hücre içinden ya da dışından gelen sinyallerle tetiklenir. İnaktif durumda, integrinler matrikse bağlanamaz çünkü ligand-bağlanma bölgesi içeren baş grupları hücre yüzeyine yakın tutulur (**Şekil 15.23**). İntegrinler aktif hale geldiğinde, baş gruplarını matrikse uzatan ve ligand bağlanmasına izin veren konformasyonel bir değişiklik geçirir. İntegrinlerin ekstraselüler matriksle bu ilk etkileşimi ilave integrinlerin adhezyon bölgesine toplanarak **fokal kompleksler** adı verilen küçük integrin kümelerinin gelişmesine neden olur. Fokal kompleksler daha sonra α-aktinin, vinkulin, talin ve forminin toplanmasıyla (ki bu aktin demeti oluşumunu başlatır, bkz. Şekil 13.4) fokal adhezyonlara dönüşür. Fokal adhezyonlar doku yapısına dahil olan çok kararlı etkileşimler olabilir ya da hücreler hareket ettikçe hızla alabora olabilir. Hücre



Şekil 15.23 Fokal adhezyonların integrin inaktivasyonundaki ve oluşumundaki rolü İntegrin baş grupları, inaktif durumda, hücre yüzeyine yakın şekilde tutulur. Sitozolden gelen sinyaller, baş gruplarını genişletip onları ekstraselüler matrikse bağlayarak integrinleri aktifleştirir. Bu durum ilave integrinlerin, fokal adhezyona dönüşen bir fokal kompleks oluşturmak için toplanmasına yol açar (bkz. Şekil 15.22).

göçü sırasında hücrenin ön ucunda yeni fokal komplekslerin oluşumu, eski fokal adhezyonlarda gerilim kaybına neden olarak integrinin ekstraselüler matriks bağlantısının etkisiz hale gelmesine yol açar.

Bitki hücrelerinin büyümek için hücre duvarlarını değiştirmesi gibi, hayvan hücreleri de büyüdükçe ve göç ettikçe ekstraselüler matriksi değiştirir. Glikozaminoglikanları ve büyük bir proteaz ailesini sindiren bazı enzim tipleri hücreler tarafından salgılanır. Bu proteazlardan tanımlanan ilki, 1962'de Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından kurbağa iribaş kuyruklarında metamorfoz sırasında keşfedilen kollajeni sindiren bir enzim (kollajenaz) idi. Bu enzim, daha sonraları matriks metalloproteaz ailesi haline gelen ve insanda 23 proteaz içeren ailenin kurucu üyesi idi. Bu enzimler, kollajen ve lamininin yanı sıra hücre yüzeyi reseptörleri ve adhezyon moleküllerini de içeren çeşitli matriks proteinlerini sindirir. Metalloproteazlar yalnızca gelişimde hücrelerin normal hareketlerinde değil kanserlerin büyümesinde ve metastazında da önemli roller oynar.

Bilgi İçin

Kanser hücreleri ekstraselüler matriksin proteinlerini sindiren proteazlar salgılar ve bu durum kanser hücrelerinin çevreledikleri dokuyu istila etmesine ve vücudun diğer kısımlarına metastaz yapmasına izin verir.

Hücre-Hücre Etkileşimleri

Hücreler arasındaki doğrudan etkileşimler, hücre ile ekstraselüler matriks arasındakiler gibi, çok hücreli canlıların gelişimi ve fonksiyonları için son derece önemlidir. Bağışıklık sistemi hücreleri arasındaki etkileşimler ve akyuvarları enfeksiyonlu doku bölgesine yönlendiren etkileşimler gibi bazı hücre-hücre etkileşimleri kısa sürelidir. Bunların dışında, kararlı hücre-hücre bağlantıları, hücrelerin doku içinde düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Örneğin; epitel hücre tabakalarının devamlılığı ve işlevleri için, birkaç farklı tip kararlı hücre-hücre bağlantısı büyük önem taşır. Hücre adhezyonuna aracılık etmenin yanı sıra özelleşmiş hücre bağlantıları hücreler arasında hızlı iletişim mekanizmaları sağlar. Bitki hücreleri de komşuları ile, sadece hücre duvarları arasındaki etkileşimle değil, aynı zamanda plazma zarları arasındaki özel bağlantılarla da birleşir.

Adhezyon bağlantıları

Hücre-hücre adhezyonu seçici bir işlemdir, başka deyişle, hücreler sadece belirli tipteki diğer hücrelere tutunur. Bu seçicilik ilk kez, bir dokuya ait hücrelerin (örn; karaciğer) farklı bir dokuya ait hücrelere değil (örn; beyin), özgül olarak, aynı dokunun hücrelerine tutunduğunu gösteren klasik embriyo gelişimi çalışmalarıyla belirlendi. Böyle seçici hücre-hücre adhezyonu,

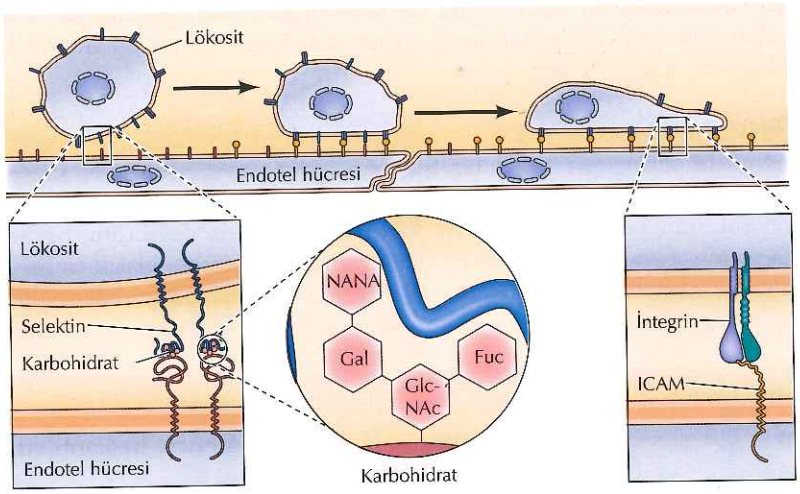
Tablo 15.2 Hücre Adhezyon Molekülleri

Aile	Tanınan ligandlar	Kararlı hücre bağlantıları
Selektinler	Karbohidratlar	Yok
İntegrinler	Ekstraselüler matriks	Fokal adhezyon ve hemidezmozomlar
	Ig süperailesi üyeleri	Genellikle yok
Ig süperailesi	İntegrinler	Genellikle yok
	Diğer Ig süperailesi proteinleri	Yok
Kadherinler	Diğer kadherinler	Adherens bağlantılar ve dezmosomlar

hücre adhezyon molekülleri denilen transmembran proteinler aracılığıyla gerçekleşir. Bu moleküller dört büyük gruba ayrılır: **selektinler, integrinler, immünglobulin (Ig) süper ailesi** (immünglobulinlere benzer yapısal bölümlere sahip oldukları için böyle adlandırılıyor) ve **kadherinler** (Tablo 15.2). Selektinler, integrinler ve çoğu kadherin aracılığıyla gerçekleşen hücre adhezyonu Ca^{2+}, Mg^{2+} veya Mn^{2+} gerektirdiğinden, hücreler arasındaki yapıştırıcı etkileşimlerin çoğu divalent katyona bağımlıdır.

Selektinler, lökositler ile endotel hücreleri veya kan trombositleri arasında geçici bağlantılara aracılık eder. Selektin ailesinin üç üyesi vardır: Lökositler üzerinde bulunan L-selektin, endotel hücreleri üzerinde bulunan E-selektin ve plateletler üzerinde bulun P-selektin. Selektinler, hücrelerin yüzeyindeki karbohidratları tanır (Şekil 15.24). En önemli görevlerinden biri, lökositlerin, dolaşımdan enfeksiyonlu doku bölgesine göçü sırasında, lökositler ile endotel hücreleri arasındaki etkileşimi başlatmasıdır. Selektinler, lökositlerin endotel hücrelerine ilk yapışmasını sağlar. Bunu, lökositlerin yüzeyindeki integrinlerin, endotel hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen ve Ig süperailesi üyeleri olan, hücreler arası adhezyon moleküllerine (ICAM'lar) bağlanarak, daha kararlı bir bağlantı oluşturmaları izler. Sıkıca tutunmuş olan lökositler, artık, kapiler duvarlarını geçer ve endotel hücreleri arasından göç edip altındaki dokuya girebilir.

ICAM'ların integrinlere bağlanması **heterofilik etkileşimlere** örnektir, çünkü, hücrenin yüzeyindeki bir adhezyon molekülü (örn; bir ICAM) diğer hücrenin yüzeyindeki farklı bir molekülü (örn; bir integrin) tanımaktadır. Ig süperailesinin diğer üyeleri, bir hücrenin yüzeyindeki bir adhezyon molekülünün, diğer hücrenin yüzeyinde aynı moleküle bağlanması şeklindeki



Şekil 15.24 Lökositler ile endotel hücreleri arasında adhezyon
Lökositler, inflamasyon olan bölgelerde, kapiler duvarlarındaki endotel hücreleri ile etkileşerek dolaşımı terk eder. Bu etkileşimin ilk aşaması, lökosit selektinlerinin, endotel hücre yüzeyindeki karbohidratlara (oligosakkarid ligandlara) bağlanmasıdır. Oligosakkarid, *N*-asetil-glukozamin (GlcNAc), fukoz (Fuc), galaktoz (Gal) ve siyalik asit (*N*-asetilnöraminik asit, NANA) içerir. Bu aşamayı, lökosit integrinleri ile, endotel hücrelerinin üzerindeki Ig süper ailesi üyeleri (ICAM'lar) arasında gerçekleşen, çok daha kararlı bağlantılar izler.

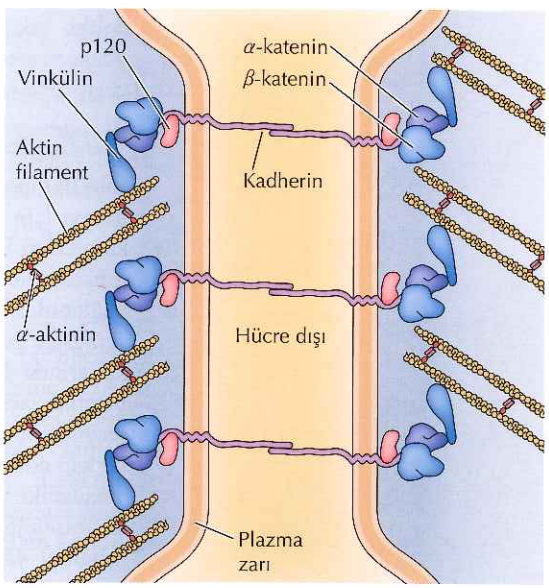
homofilik etkileşimleri gerçekleştirir. Bu şekildeki homofilik etkileşim, aynı tipten hücreler arasında seçici yapışmayı sağlar. Örneğin, sinir hücresi adhezyon molekülleri (N-CAM'lar), sinir hücreleri üzerinde bulunan Ig süperailesi üyeleridir ve N-CAM'lar arasındaki homofilik bağlanmalar gelişim sürecinde sinir hücreleri arasında seçici toplulukların oluşmasına katkı sağlar. Çeşitli hücre-hücre etkileşimlerine aracılık eden 100'den fazla Ig süper ailesi üyesi bulunmaktadır.

Hücre adhezyon moleküllerinin dördüncü grubu kadherinlerdir. Kadherinler, embriyonik hücreler arasındaki seçici yapışmalarda, sinir sisteminde özel sinapsların oluşmasında rol oynar ve dokularda hücreler arasında kalıcı bağlantıların oluşumundan sorumlu temel proteinlerdir. Kadherinler, genellikle homofilik etkileşimlerde görev alan ve ekstraselüler bölümü farklı üyelerinde büyük oranda korunmuş olan büyük bir protein ailesidir (100'den fazla üye). Örneğin, E-kadherin, epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunur, dolayısıyla E-kadherinler arasında homofilik ilişkiler epitel hücrelerin birbirine seçici olarak yapışmasını sağlar. Hücre davranışının denetiminde hücre-hücre etkileşimlerinin önemine örnek olarak, E-kadherin kaybının, epitel hücre kökenli kanserlerin gelişimine neden olmasından söz edilebilir. Kadherin ailesinden N-kadherin (sinir hücresi kadherini) ve P-kadherin (plasenta kadherini) gibi diğer üyeler de diğer hücre tiplerinin seçici yapışmalarına aracılık eder. Hem transmembran hem de sitozolik bölümleri açısından farklı birkaç kadherin alt ailesi bulunur (klasik kadherinler, dezmozomal kadherinler ve protokadherinler).

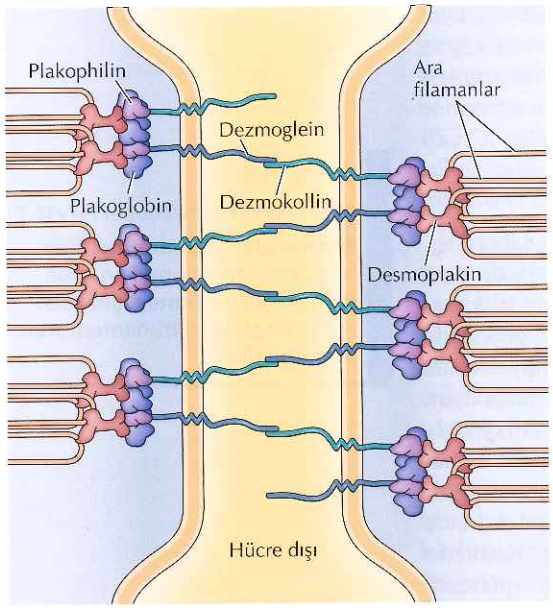
Video 15.3
sites.sinauer.com/cooper7e/v15.3
Kadherinler Kadherinler hücre-hücre adhezyonu için esas olan ve işlev görmek için kalsiyuma bağlı olan transmembran proteinleridir.

Ig süperailesi proteinlerinin (örn., N-CAM) sinapslardaki nöronlar arasında kararlı bağlantıların oluşumuna katılmasına rağmen, selektinler, integrinler ve çoğu Ig süperailesi üyelerinin aracılık ettiği hücre-hücre bağlantıları genellikle geçicidir. Bitişik hücrelerin hücre iskeletlerinin dahil olduğu kararlı adhezyon bağlantıları ise, genellikle kadherinler aracılığıyla gerçekleşir. Bölüm 13'te tartışıldığı gibi, bu hücre-hücre bağlantıları iki tiptir: **adherens bağlantılar** ve **dezmozomlar.** Bu bağlantılarda, klasik ve dezmozomal kadherinler, sırasıyla, aktin demetlerine ve ara filamanlara bağlanır ve bu bağlanma sitozolik uçlarının β-katenin veya desmoplakin ile etkileşimine dayanır. Dolayısıyla, kadherinlerin, bitişik hücre iskeletlerini ilişkilendirmedeki rolü, integrinlerin hücrelerle ekstraselüler matriks arasında kararlı bağlantılar oluşturmasına benzer.

Adherens bağlantının temel yapısal birimi, klasik transmembran kadherinlere ek olarak β-katenin, p120 ve α-katenin içerir (**Şekil 15.25**). β-katenin ve p120 armadillo protein ailesinin (*Drosophila* β-katenin proteinine adını verdi) benzer üyeleridir. Kadherinlerin sitozolik kuyruğuna bağlanıp bağlantıların kararlılığını sürdürmede rol oynar. Ayrıca β-katenin α-katenine (adına rağmen armadillo ailesi üyesi değildir) bağlanır. α-katenin vinkuline bağlanır ve o da



Şekil 15.25 Adherens bağlantıları Adherens bağlantılarda, kadherinler, bir hücrenin aktin filamanlarını (hücre iskeletini) diğer hücrenin aktin filamanlarına bağlar. Klasik transmembran kadherinleri β-katenin ve p120'ye bağlanarak bağlantının kararlılığını düzenler. β-katenin ayrıca α-katenine bağlanarak, vinkülinle etkileşimin sonucunda, aktin filamanları adherens bağlantılar ile birleştirir.



Şekil 15.26 Dezmozomlar Dezmozomlarda, dezmozomal kadherinler (desmoglein ve dezmokolin) komşu hücrelerin ara filamanlarına bağlanır. Plakoglobin ve plakofilin, kadherinlerin sitozolik kuyruklarına ve ara filamanlara bağlanan plakin ailesi proteini, desmoplakine bağlanır.

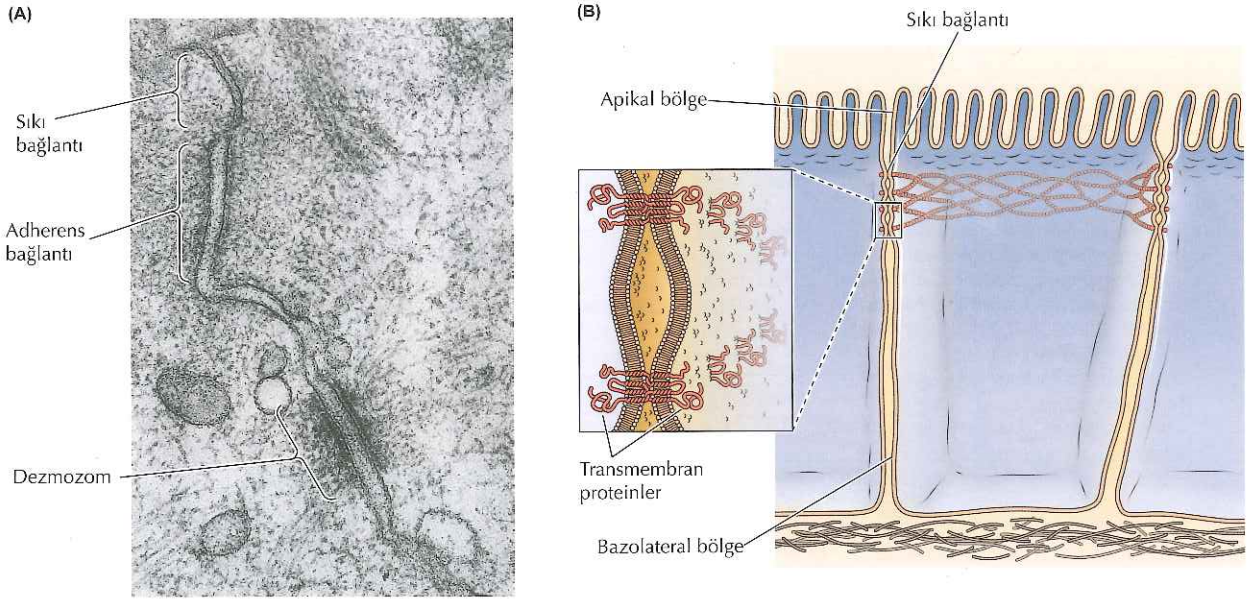
aktine bağlanır, böylelikle adherens bağlantıları aktin hücre iskeletine bağlar. Dolayısıyla kateninler, bir hücrenin aktin hücre iskeletini bitişik bir hücrenin aktin hücre iskeletine transmembran kadherinler yoluyla bağlamaya hizmet eder.

Kadherinlere ek olarak, ikinci bir hücre adhezyon molekülü olan **nektin** de adherens bağlantılarda bulunur. Bilinen dört çeşit nektin ve Ig süperailesi üyesi olan nektin ilişkili proteinlerden oluşan bir benzer aile vardır. Kadherinler gibi nektinler de homofilik olarak etkileşir. Bununla birlikte nektinler ayrıca yandaki hücre zarında bulunan farklı nektinlere heterofilik olarak da bağlanabilir. Nektinlerin bu tür heterofilik bağlanması, örneğin beyinde sinir hücreleri ya da glia hücreleri arasında olduğu gibi, farklı hücre tipleri arasındaki ilişkilere aracılık eder. Kadherinler gibi nektinler de aktin hücre iskeletine bağlanır. Heterotipik hücre bağlantılarının yanı sıra, sıklıkla nektinlerin başlattığı homotipik hücre bağlantıları kadherinleri adhezyon bölgelerine toplar.

Adherens bağlantıların aksine, dezmozomlar ara filamanları (aktine değil de) bitişik hücrelerin hücre iskeletlerine doğrudan bağlar (**Şekil 15.26**). Dezmozomal kadherinler, **dezmoglein** ve **dezmokollin** bağlantı boyunca tutunur. Armadillo ailesi proteinleri plakoglobin ve plakofilin dezmozomal kadherinlerin sitozolik ucuna bağlanır ve ara filaman bağlayıcı protein desmoplakine eklemlenebilmesi için doğrudan bir bağlantı sağlar. Desmoplakin, hemidezmozomlarda ara filamanlara bağlanmada benzer işlev gören plektin ile ilişkilidir (bkz. Şekil 15.22). Hücreler arasındaki dezmozomal bağlantıların gücü hem tutundukları ara filamanların hem de ara filamanları kadherinlere bağlayan plakoglobin, plakofilin ve desmoplakin arasındaki çoklu etkileşimlerin özelliğidir. Dezmozomal kadherinler ve armadillo ailesi proteinleri için çok sayıda gen dezmozom özelliklerinde dokuya özgü çeşitliliğe izin verir.

Sıkı bağlantılar

Sıkı bağlantılar, epitel hücre tabakalarının sıvı bölmeleri arasındaki engelleyici görevi için son derece önemlidir. Örneğin barsak epiteli, barsak lümenini, kan kapilerleri içeren alttaki bağ dokusundan ayırır. Sıkı bağlantılar, epitellerin bu gibi engelleme işlevlerini yerine getirmesini sağlayan iki rol oynar. İlk olarak, sıkı bağlantılar, epitel tabakasının hücreleri arasından moleküllerin (iyonlar dahil) serbestçe geçmesini engelleyen contalar oluşturur. İkinci olarak, sıkı bağlantılar, aralarında lipidlerin ve zar proteinlerinin serbest difüzyonunu engelleyerek, plazma zarlarının apikal ve bazolateral bölümlerini ayırır. Böylece, apikal ve bazolateral bölgelerdeki özelleşmiş taşıma sistemleri, glukozun barsak lümeni ile kan dolaşımı arasında taşınmasında olduğu gibi, farklı ekstraselüler bölmeler arasındaki molekül trafiğini denetleyebilir (bkz. Şekil 14.32). Sıkı bağlantılar ekstraselüler boşluğa karşı etkin contalar olsa da, yandaki hücreler arasında minimal yapıştırıcı güç sağlar ve böylece bir **bağlantısal kompleks** içinde



Şekil 15.27 Bağlantı kompleksi (A) Bir sıkı bağlantıyı, bir adherens bağlantıyı ve bir dezmozomu kapsayan bağlantı kompleksi ile birleşmiş epitel hücrelerine ait elektron mikrografı. (B) Sıkı bağlantılar, bitişik hücreler üzerindeki transmembran protein iplikleri arasındaki etkileşimlerle oluşur.

genellikle adherens bağlantılar ve dezmozomlar ile ilişkilidir. (Şekil 15.27).

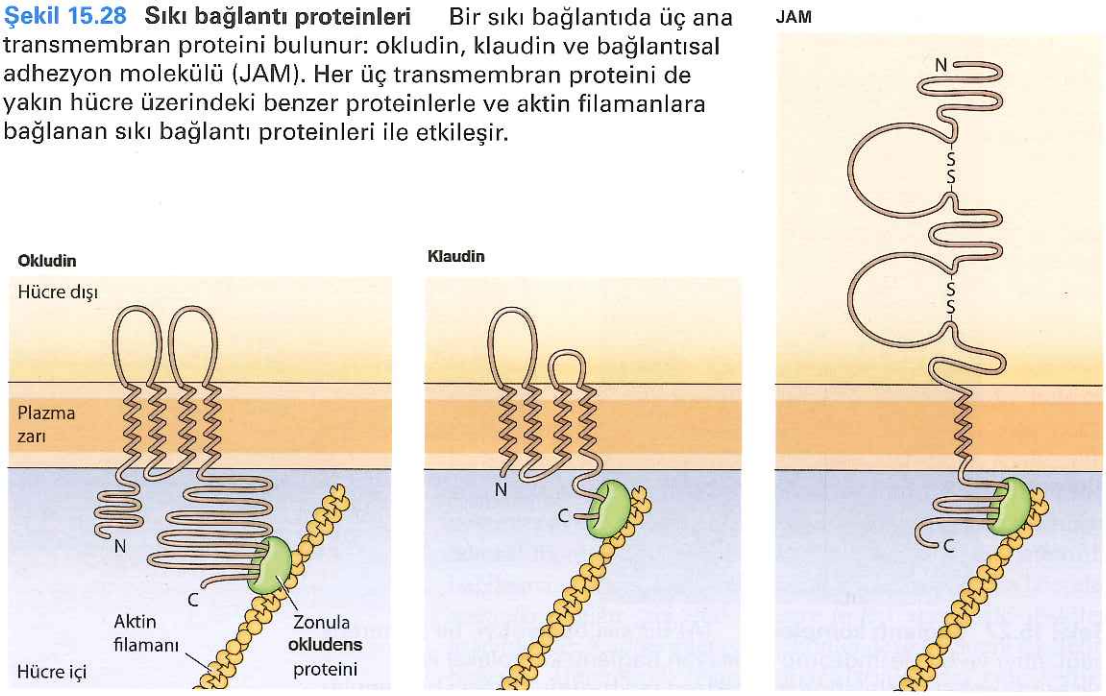
Sıkı bağlantılar, bitişik hücreler arasında, bilinen en yakın temastır. Başlangıçta, plazma zarlarının dış tabakaları arasında belirgin kaynaşma noktaları olarak tanımlanmış olmalarına karşın, bugün zarlar arasında bir kaynaşma olmadığı açıktır. Aslında, sıkı bağlantıların, hücrenin tüm çevresini dolanan bir protein iplikleri ağından oluştuğu görülür (bkz. Şekil 15.27B). Bu ağdaki ipliklerden her biri, transmembran proteinleri olan okludin, klaudin ve bağlantısal adhezyon molekülü (JAM) ailelerinden oluşur (Şekil 15.28). Bu proteinlerin tümü bitişik hücrelerdeki benzer proteinlere bağlanarak plazma zarları ile aralarındaki alanı kapatır. Okludin, klaudin ve JAM'ların sitozolik kuyrukları zonula okludens ailesinin proteinleri ile ilişkilidir. Bu aile sıkı bağlantı kompleksini aktin hücre iskeletine bağlar ve plazma zarındaki sıkı bağlantıyı yerinde tutar. Epitel hücre tabakaları istilacı mikroorganizmalara karşı önemli engeller oluşturur. Patojen bakterilerin bağlantı komplekslerini bozmak için geliştirdikleri stratejiler hücreler arasındaki epitel tabakalara nüfuz etmelerine olanak sağlar.

Bilgi İçin

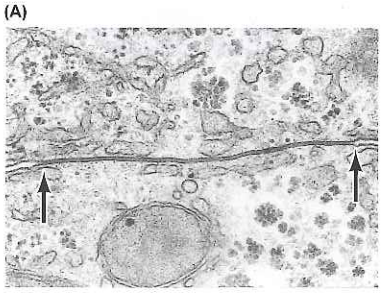
Epitel hücre tabakaları istilacı mikroorganizmalara karşı önemli engeller oluşturur. Patojen bakterilerin bağlantı komplekslerini bozmak için geliştirdikleri stratejiler hücreler arasındaki epitel tabakalara nüfuz etmelerine olanak sağlar.

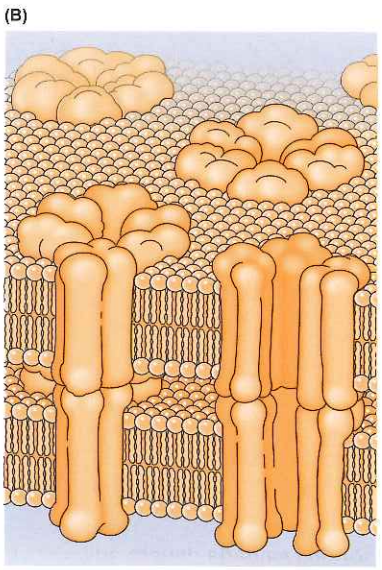
Aralık bağlantıları

Çok hücreli organizmalarda bulunan bireysel hücrelerin eylemlerinin birbirine göre ayarlanması gerekir ve bu, Bölüm 16'da tartışılacağı üzere, bir hücreden salınıp diğer hücre üzerinde etkili olan sinyal molkülleri ile yerine getirilir. Ancak, örneğin karaciğer gibi tek bir dokunun içinde, hücreler çoğunlukla, bitişik hücrelerin sitoplazmaları arasındaki doğrudan bağlantılar sağlayan **aralık bağlantılar** ile birbirine bağlıdır. Aralık bağlantıları, açıldığında iyonların ve küçük moleküllerin (yaklaşık olarak 1000 daltondan az) komşu hücreler arasında geçmesine olanak veren, plazma zarlarını kat eden kontrollü



Şekil 15.28 Sıkı bağlantı proteinleri Bir sıkı bağlantıda üç ana transmembran proteini bulunur: okludin, klaudin ve bağlantısal adhezyon molekülü (JAM). Her üç transmembran proteini de yakın hücre üzerindeki benzer proteinlerle ve aktin filamanlara bağlanan sıkı bağlantı proteinleri ile etkileşir.





kanallardır. Sonuç olarak, aralık bağlantılar, birleştirdikleri hücrelerin hem metabolik aktivitelerini hem de elektrik yanıtlarını eşler. Epitel hücreleri, endotel hücreleri, kalp kası ve düz kas hücreleri gibi, hayvan dokularındaki hücrelerin çoğu, aralık bağlantılar yoluyla haberleşir. Kalp kası hücreleri gibi elektrikle uyarılabilen hücrelerde aralık bağlantılardan iyonların doğrudan geçişi, komşu hücrelerin de kasılmalarını eşler ve senkronize eder. Aralık bağlantılar, aynı zamanda, cAMP ve Ca^{2+} gibi bazı hücre içi sinyal iletim moleküllerinin de bitişik hücreler arasında geçişine izin vererek dokuyu oluşturan hücrelerin yanıtlarını eşgüdümler.

Sıkı bağlantılar, en az 21 farklı insan proteinini kapsayan, **konneksin** ailesinden transmembran proteinlerle yapılmıştır. Altı konneksin, merkezinde sulu, açık bir geçit bulunan bir silindir oluşturur (Şekil 15.29). Bir hücrenin plazma zarındaki böyle bir konneksin grubu, **konnekson** olarak adlandırılır ve daha sonra bitişik bir hücrenin konneksonu ile aynı hizaya gelerek, iki sitoplazma arasında bir kanal oluşturur. İki hücrenin plazma zarları, konneksinlerin ekstraselüler kısımlarının kapladığı alana uygun bir aralıkla ayrılır—bu nedenle, elektron mikroskopisi uzmanları "aralık bağlantı" adını türettiler. Birçok hücre konneksin ailesinin birden fazla üyesini eksprese eder ve böylece, farklı konneksin proteinlerinin kombinasyonları çeşitli nitelikte aralık bağlantıları ortaya çıkarabilir.

Aralık bağlantılarının özelleşmiş birliktelikleri özel sinir hücrelerinde meydana gelir ve bir **elektriksel sinaps** oluşturur. Elektriksel sinapsta

Şekil 15.29 Aralık bağlantılar (A) İki karaciğer hücresi arasındaki aralık bağlantının (oklar) elektron mikrografı. (B) Aralık bağlantılar, konnekson adı verilen altı adet konneksinin, bitişik hücrelerin plazma zarları içerisinde açık kanallar oluşturacak biçimde bir araya gelmesiyle oluşur.

Moleküler Tıp

Aralık Bağlantısı Hastalıkları

Hastalık

Birbiri ile ilişkisi olmayan çeşitli insan hastalıklarının aralık bağlantılarının konneksin proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bu hastalıklardan ilki, Charcot-Marie-Tooth (CMT) hastalığının X'e bağlı olan formu olarak tanımlanmış olup hastalık 1993 yılında konneksin 32'yi kodlayan gendeki mutasyonlara haritalanmıştır. CMT, kas kontrolünün yavaş yavaş kaybı ve en sonunda kas dejenerasyonu ile ortaya çıkan ve periferik sinirlerin sürekli dejenerasyonuna yol açan kalıtsal bir hastalıktır. Günümüzde CMT'ye neden olduğu bilinen 200'den fazla farklı konneksin 32 mutasyonu vardır. CMT aynı zamanda miyelin proteinlerini kodlayan farklı genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanabilir. Bu mutasyonlar doğrudan miyelinli sinirlerin dejenerasyonuna neden olan kusurlara yol açar. Buna ek olarak, CMT'nin bir formu insan nükleer lamin A genindeki bir mutasyona haritalanmıştır (bkz. Bölüm 10 MolekülerTıp, Nükleer Lamina Hastalıkları).

CMT'nin bir konneksindeki mutasyonlardan kaynaklanabileceği bulgusu, aralık bağlantılarının miyelinli sinirlerde kritik bir rol oynuyor olabileceği anlamına geliyordu. Üstelik CMT, bugün kökenini insan konneksinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlardan aldığı bilinen birkaç kalıtsal hastalıktan sadece ilki idi. Konneksin mutasyonlarının en yaygın patolojik sonuçları katarakt, cilt hastalıkları ve sağırlıktır.

Moleküler ve Hücresel Temel

İnsan genomu üç alt aileye bölünen (α, β ve γ) ve farklı konneksinleri (Cx genleri) kodlayan 21 gen içermektedir. Bu genlerdeki mutasyonlardan sekiz tanesi insan hastalığı nedeni olarak tanımlanmıştır (bkz. tablo). Örneğin, Cx32/β1 mutasyonları Charcot-Marie-Tooth hastalığı ve sağırlık ile ilişkilidir. Konneksin proteinleri yaygın olarak eksprese edilir. Cx32/α1 periferik sinir, karaciğer ve beyin dokularında, aynı zamanda işitme kaybı ile de ilişkilendirilen Cx43/α1 ise 35'i aşkın farklı insan dokusunda eksprese edilir. Bu nedenle, konneksin mutasyonlarının neden olduğu bilinen insan hastalıkları çeşidinin ondan az olması şaşırtıcıdır. Birçok dokuda birkaç farklı konneksin proteini eksprese olduğu için, pek çok dokuda bir tek konneksin kaybından kaynaklanan bir kusur olmamasının en basit açıklaması diğer konneksinlerin eksik konneksini telafi etmesidir. O zaman da karşımıza, tek bir konneksin genindeki herhangi bir mutasyonun neden hastalığa yol açtığı sorusu çıkmaktadır.

CMT'de Cx32/β1 mutasyonlarının ilk keşfi, çeşitli ailelerdeki sekiz farklı mutasyona dayalı idi: koruyucu olmayan amino asit değişimlerine yol açan altı adet tek baz değişikliği, kısa protein oluşumuna neden olan bir adet çerçeve kayması ve genin promotör bölgesinde bir adet mutasyon. Cx32/α1 genindeki bu sekiz mutasyon ve ardından tespit edilen 262 diğer mutasyon, kinik olarak aynı CMT'ye neden olup, miyelinli sinirin özellikle aralık bağlantı kusurlarına karşı hassasiyet gösteren bir doku olabileceğini düşündürmektedir. Diğer üç doku da konneksin mutasyonlarına duyarlı görünmektedir: göz merceği, iç kulak duyu epiteli ve cilt. Göz merceğinin duyarlılığını anlamak en kolaydır çünkü mercek lif hücreleri gelişim sırasında organellerinin çoğunu kaybeder ve ışık geçişini sağlamak için kristalin proteini ile dolar. Bu hücreler, lens epitel hücrelerinden aralık bağlantılar aracılığıyla besin ve iyonları almak zorundadır ve bunların kaybı katarakt oluşumuna yol açar.

İç kulak duyu epitelinin hassasiyeti, epitel hücrelerin aralık bağlantısal iletişim aracılığıyla hızla K^+ değişimi yapma ihtiyacı ile ilgilidir. Burada daha az net olan konu ise, derinin dış katmanlarının aşırı büyümesinin temelidir, ancak aralık bağlantılarının proliferasyon ile diferansiyasyon arasındaki dengede rol oynadığı ve aralık bağlantısal mutasyonların bu dengeyi sarstığı düşünülmektedir.

Bu dokuların her biri ilave konneksinler eksprese eder ve konneksin mutantın kaybını telafi etmedeki eksikliği iki fenomene dayalı gibi görünmektedir. Aralık bağlantılar farklı konneksinlerin kombinasyonlarından oluşabilmesine rağmen, tüm konneksinlerin işlevsel konneksonlar oluşturmak için işbirliği yapmaları mümkün değildir. Bu nedenle, hassas dokulardaki konneksinler mutasyona uğramış bir konneksinin yokluğunu telafi edemeyebilir. Buna ek olarak, aralık bağlantı konneksonları hücre yüzeyinde değil de Golgi aygıtında ya da daha önceki salgı sürecinde bir araya getirilir. Böylece, düzgün işlenememiş ve dışarıya verilememiş bir tek mutant konneksin, dominant negatif olarak rol oynayabilir ve bu dokuda eksprese edilen normal konneksinlerin işlenmesini engelleyebilir. Bu durum, son zamanlarda konjenital katarakta neden olan bir Cx46/α3 mutantı için rapor edilmiştir: Mutant protein ERGIC'ten (ER-Golgi ara bölmesi) veya Golgi kompleksinden çıkmayı başaramaz veya beraberinde normal konneksinleri kapana kıstırır. Bu nedenle, belirli hastalıkların konneksin mutasyonları ile olan

İnsan Hastalığında Aralık Bağlantı Mutasyonları

Hastalık	Konneksin proteinleri[a]
Charcot-Marie-Tooth hastalığı	Cx32/β1
Sağırlık	Cx26/β2, Cx30/β6, Cx31/β3, Cx32/β1, Cx43/α1
Deri hastalıkları	
Erythrokeratoderma variabilis	Cx31/β3, Cx30.3/β4
Vohwinkel sendromu	Cx26/β2
Katarakt	Cx46/α3, Cx50/α8

[a]Cx proteinleri ya moleküler ağırlıklarına ya da bir alt aile üyesi olarak adlandırılmıştır.

(sonraki sayfada devam edilmiştir)

Moleküler Tıp

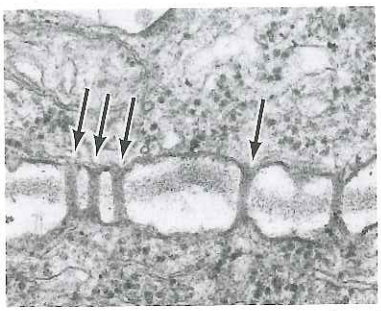
ilişkisi, belirli bir dokudaki aralık bağlantısal gereksinimlerden olabileceği gibi o dokuda eksprese edilen konneksinler ile etkileşimlerin doğası arasındaki ilişkiden kaynaklanabileceği görülmektedir.

Önlem ve Tedavi

Konneksin genlerindeki mutasyonların yol açtığı çeşitli insan hastalıklarının tanımlanması, normal doku işlevinde aralık bağlantılarının önemini göstermektedir. Doku yapısı veya fonksiyonu için kritik olan diğer bağlantılar gibi, aralık bağlantıları da bazı kalıtsal insan hastalıkları için açık konumlar olarak görünmektedir, ancak bu tür hastalıklar nadirdir. Aralık bağlantı konneksonlarının işlenmesi ve bir araya getirilmesindeki son keşifler, bu nadir hastalıkların temelini açıklamaya başlamıştır. İnsan konneksin genlerinin tümünün tanımlanmış olduğu düşünülse de, proteinlerin doku dağılımı – özellikle embriyonik gelişim sırasında - pek iyi anlaşılamamıştır. Konneksin proteinlerinin dağılımı ve etkileşimleri hakkında edinilecek yeni bilgiler, konneksin genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanan patolojilerin her birini anlamak için bir temel oluşturacaktır. Ancak o zaman, olası telafi edici tedaviler–örneğin ciltteki hücre proliferasyonunu düzenleyen veya iç kulaktaki K^+ değişimini ayarlayan- geliştirilebilir.

Kaynaklar:

Pfenniger, A., A. Wohlwend and B. R. Kwak. 2011. Mutations in connexin genes and disease. *Eur. J. Clin. Invest* 41: 103-116.

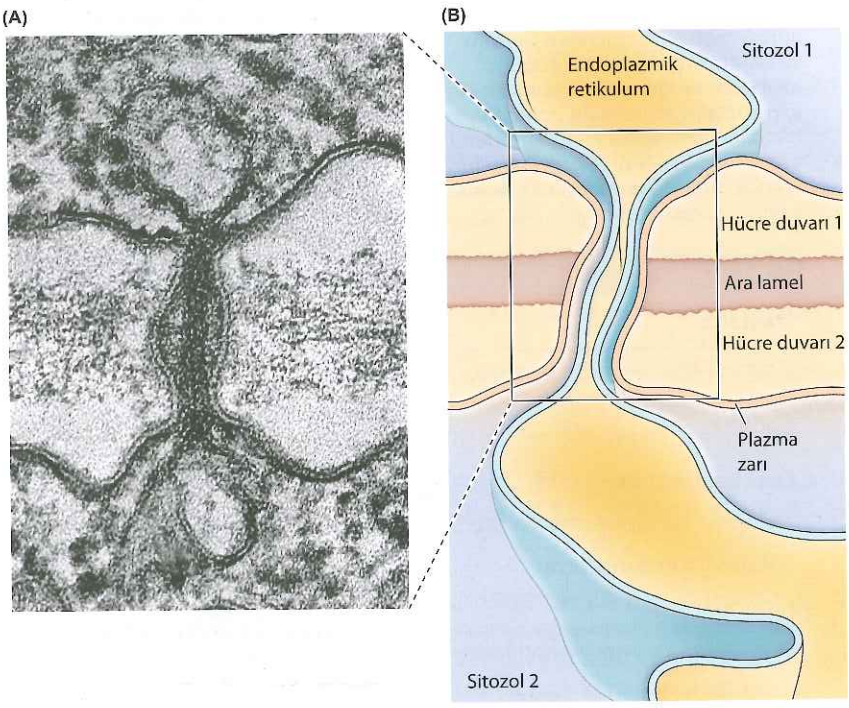


Şekil 15.30 Plasmodesmata Plazmodesmatanın (oklar) elektron mikrografı.

bulunan bireysel konneksonlar, birkaç çeşit sinyale yanıt olarak açılabilir ya da kapanabilir, ancak açıkken iki sinir hücresi arasında iyonların geçişine izin verir. Aralık bağlantılarının, özellikle de sinir sistemindeki önemi, çok sayıda insan hastalığının konneksin mutasyonları ile ilişkili olmasıyla gösterilmiştir.

Plazmodesmata

Bitki hücreleri arasındaki adhezyon transmembran proteinlerle değil hücre duvarlarıyla gerçekleşir. Özellikle, hücre duvarındaki pektince zengin, **orta lamel** denilen özel bir bölge, bitişik hücreleri bir arada tutan bir yapıştırıcı gibi davranır. Bitki hücre duvarlarının sert olması nedeniyle, bitki hücreleri arasındaki kararlı bağlantılar, hayvan hücrelerindeki dezmozomlar ve adherens bağlantılardaki gibi, hücre iskeletleri arasında bağlantı oluşumunu gerektirmez. Ancak, bitişik bitki hücreleri, **plazmodesmata** (tekil, plazmodesma) denilen sitoplazma bağlantıları aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurar (Şekil 15.30). Farklı bir yapıda olmasına rağmen plazmodesmata, aralık bağlantılara benzer şekilde, dokulardaki bitişik hücreler arasında doğrudan iletişimin bir yolu olarak çalışır. Ayrıca plazmodesmata, transkripsiyon faktörleri ve miRNA'lar gibi düzenleyici moleküllerin hücreler arasında doğrudan hareketine izin vererek bitkilerdeki sinyal iletiminde önemli bir rol oynar.



Şekil 15.31 Plasmodesma yapısı Bir plasmodesmata, komşu hücrelerin plazma zarları sürekli olup bitişik hücrelerin hücre duvarları arasında sitoplazmik kanallar oluşturur. Endoplazmik retikulumun uzantısı genellikle kanal içinden geçer (A, From L. Tilney et al., 1991. *J. Cell Biol.* 112: 739-748.)

Plazmodesmata, bitki hücre mitozu sonrasında yavru hücrelerin tamamlanmamış ayrılmasından oluşabilir. Ayrıca bitişik hücreler arasında yeni plazmodesmata oluşabilir. Her plazmodesmada, bir hücrenin plazma zarı komşu hücreninkiyle devam eder ve böylece, iki sitozol arasında açık bir kanal oluşur (**Şekil 15.31**). Düz endoplazmik retikulumun bir uzantısı, iyonların ve küçük moleküllerin hücreler arasında serbestçe geçebildikleri bir sitoplazma halkası bırakarak bu kanaldan geçer. Plazmodesmata uygun bir uyarıya yanıt olarak açılıp kapanabilen dinamik yapılardır ve bu şekilde bitişik hücreler arasında makromoleküllerin ve daha büyük yapıların denetimli geçişine olanak sağlar. Ayrıca, proteinler ve lipidler özel sinyallere yanıt olarak plazmodesmataya hedeflenebilir. Plazmodesmata, böylece, transkripsiyon faktörleri ve düzenleyici RNA'lar gibi düzenleyici moleküllerin hücreler arasındaki trafiğini denetleyerek bitki gelişiminde önemli bir rol oynayabilir.

ÖZET

Hücre Duvarları

- ***Bakteri hücre duvarları:*** Bakteri hücre duvarlarının temel bileşeni, kısa polipeptidlerle birbirine bağlanmış polisakkarid zincirlerinden oluşan bir peptidoglikandır.
- ***Ökaryotik hücre duvarları:*** Mantar, alg ve yüksek bitkilerin hücre duvarları, polisakkarid ve protein içeren jelimsi bir matriks içerisine gömülmüş, ipliksi polisakkaridlerden (örn; selüloz) oluşmuştur. Sert hücre duvarları, bitki hücrelerinin su alarak hızla genişlemesine olanak verir. Bkz. **Animasyon 15.1**.

Ekstraselüler Matriks ve Hücre-Matriks Etkileşimleri

- ***Matriks yapısal proteinleri:*** Ekstraselüler matriksin başlıca yapısal proteinleri büyük kollajen protein ailesinin üyeleridir. Kollajenler bağ dokunun ekstraselüler matriksini tanımlayan lifçikler oluşturmanın yanı sıra bazal laminada ağlar meydana getirir.
- ***Matriks polisakkaridleri:*** Glikozaminler ve proteoglikanlar formundaki polisakkaridler ekstraselüler matriksin esas kısmını oluşturur. Bunlar kolajen liflere bağlanarak onları değiştirir ve diğer matriks proteinleri ile etkileşir.
- ***Adhezyon proteinleri:*** Adhezyon proteinleri ekstraselüler matriks bileşenlerini birbirine bağlar ve çoğu hücre-matriks adhezyonlarına aracılık eden integrinler için esas bağlanma bölgeleridir.
- ***Hücre-matriks etkileşimleri:*** İntegrinler hücreleri ekstraselüler matrikse tutunduran esas hücre yüzeyi reseptörleridir. İntegrinler, fokal adhezyonlarda ve hemidezmozomlarda ekstraselüler matriks ile, sırasıyla, aftin ve ara filaman hücre iskeletleri arasında kararlı bağlantılar sağlar. Bkz. **Videolar 15.1** ve **15.2.**

Hücre-Hücre Etkileşimleri

- ***Adhezyon bağlantıları:*** Seçici hücre-hücre etkileşimleri dört büyük hücre adhezyon protein grubu tarafından organize edilir: selektinler, integrinler, immünglobulin süperailesi üyeleri ve kadherinler. Kadherinler, hücre-hücre bağlantılarında bitişik hücrelerin hücre iskeletlerini birbirine bağlar. Bkz. **Video 15.3.**

ANAHTAR SÖZCÜKLER

peptidoglikan

kitin, selüloz, hemiselüloz, pektin, birincil hücre duvarı, ikincil hücre duvarı, lignin, turgor basıncı, oksin, selüloz sentaz

ekstraselüler matriks, bazal lamina, kollajen, kollajen fibrili, prokollajen, elastik lif, elastin

glikozaminoglikan (GAG), proteoglikan

fibronektin, laminin, nidojen

integrin, fokal adhezyon, hemidezmozom

hücre adhezyon molekülü, selektin, immünglobulin (Ig) süperailesi, kadherin, heterofilik etkileşim, homofilik etkileşim, adherens bağlantı, dezmozom, armadillo protein ailesi, nektin, desmoglein, desmokollin

ÖZET

- ***Sıkı bağlantılar:*** Sıkı bağlantılar, epitel hücreleri arasında moleküllerin serbest geçişini önler ve epitel hücre plazma zarının apikal ve bazolateral bölgelerini birbirinden ayırır.
- ***Aralık Bağlantılar:*** Aralık bağlantılar, bitişik hücrelerin sitozollerini bağlayan denetimli kanallardır. Elektriksel sinapslar sinir sistemi hücreleri arasında sinyal iletimini sağlayan aralık bağlantılarıdır.
- ***Plazmodesmata:*** Bitişik bitki hücreleri birbirine, plazmodesmata adı verilen sitoplazma bağlantılarıyla bağlıdır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

sıkı bağlantı, bağlantı kompleksi

aralık bağlantı, konneksin, konnekson, elektriksel sinaps

orta lamel, plazmodesma

Atıf

Hücre

Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Sorular

1. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler arasında, hücre duvarları ile bitişik zarlarda ne gibi farklar vardır?
2. Bakteriyel hücre iskeleti proteinleri hücre şeklini nasıl belirler?
3. Hayvan hücrelerinde Na^+–K^+ pompasının önemli işlevlerinden biri, ozmotik dengenin korunmasıdır. Bitki hücrelerinde bu neden gerekmez?
4. Hemiselüloz bitki hücre duvarlarının yapısal gücünü nasıl kuvvetlendirir?
5. Barsak epitel hücrelerinin plazma zarlarının apikal ve bazolateral bölgelerine, farklı glukoz taşıyıcıların seçilerek hedeflenmesinin önemi nedir? Bu süreçte sıkı bağlantıların rolü nedir?
6. Lisil hidroksilaz enziminin (kolajen lizin artıkları hidroksile sorumlu enzim) inhibitörü bir hücre tarafından sentezlenmiş kollajen stabilitesini nasıl etkiler?
7. Fibril-oluşturucu kollajenler hücrelerin içinde neden üçlü heliksler içine toplanır?
8. Glikozaminoglikanların (GAG'lar) hangi özelliği hidratlı jeller oluşturmalarına izin verir?
9. Sadece epitel hücrelerinin apikal plazma zarında bulunan bir taşıyıcı üzerinde çalışıyorsunuz. Epitel hücrelerini bir klaudin ailesi proteininin ekstraselüler birimine benzer bir sentetik peptid ile muamele ediyorsunuz. Muamele sonrasında, taşıyıcı artık plazma zarının hem apikal hem de bazolateral kısımlarında bulunuyor. Peptidin, taşıyıcının konumlanmasını bozan muhtemel mekanizması ne olabilir?
10. Epitel hücrelerinde ekstraselüler birimi eksik olan bir dominant negatif E-kadherini yüksek oranda eksprese ettiniz. Bu mutant hücre-hücre adhezyonunu nasıl etkiler?
11. Bir epitel hücresi mutasyonu, $\alpha_6\beta_4$ integrinin bir sitoplazmik birimi silinerek eksprese olmasına yol açıyor. Bu mutasyon epitel hücrenin bazal laminaya adhezyonunu nasıl etkiler?
12. Elektriksel sinaps nedir? Nasıl bir işlevi vardır?
13. Aralık bağlantıları ve plazmodesmata nasıl benzerlikler gösterir? Bu yapıların hayvanlarda ve bitkilerde analog ya da homolog yapılar olmaları olası mıdır?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar (Her ana bölüm için en önemli derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Hücre Duvarları

Cabeen, M. T. and C. Jacobs-Wagner. 2007. Skin and bones: the bacterial cytoskeleton, cell wall, and cell morphogenesis . *J. Cell Biol. 179:* 381-387. [R]

Celler, K., R. L. Koning, A. J. Koster and G. P. van Wezel. 2013. Multidimensional view of the bacterial cytoskeleton. *J. bacterial.* 195: 1627-1636. [R]

Cosgrove, D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 850-861. [R]

Lerouxel, O., D. M. Cavalier, A. H. Liepman and K. Keegstra. 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides—a complex process. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 621-630. [R]

Merzendorfer, H. 2011. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *Eur. J. Cell Biol.* 90: 759-769. [R]

Oda, Y. and H. Fukuda. 2012. Secondary cell wall patterning during xylem differentiation . *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 38-44. [R]

Paredez, A., A. Wright and D. W. Ehrhardt. 2006. Microtubule cortical array organization and plant cell morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 571-578. [R]

Pauly, M. and K. Keegstra. 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J.* 54: 559-568. [R]

Somerville, C. 2006. Cellulose synthesis in higher plants . *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 53-78. [R]

Wasteneys, G. O. and J . C. Ambrose. 2009. Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol.* 19: 62-71. [R]

Ekstraselüler Matriks ve Hücre-Matriks Etkileşimleri

Barczyk, M., S. Carracedo and D. Gullberg. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res.* 339: 269-280. [R]

Berrier, A. L. and K. M. Yamada. 2007. Cellmatrix adhesion. *J. Cell Physiol.* 213: 565-573. [R]

Bishop, J . R., M. Schuksz and J. D. Esko. 2007. Hepar an sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446: 1030-1037. [R]

Bouvard, D., J. Pauwels, N. De Franceschi and J. Ivaska. 2013. Integrin inactivators: balancing cellular functions *in vitro* and *in vivo*. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 430-442 . [R]

Calderwood, D. A, I. D. Campbell and D. Critchley. 2013. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 503-517. [R]

Durbeej, M. 2010. Laminins. *Cell Tissue Res.* 339: 259-268. [R]

Hynes, R. O. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326: 1216-1219. [R]

Lecuit, T. 2005. Adhesion remodeling underlying tissue morphogenesis. *Trends Cell Biol.* 15: 34-42. [R]

Leitinger, B. 2011. Transmembrane collagen receptors. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 27: 25-56. [R]

Moser, M., K. R. Legate, R. Zent and R. Fassler. 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 324: 895-899. [R]

Mouw, J. K., G. Ou and V. M. Weaver. 2014. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 771-785. [R]

Page-McCaw, A, A J. Ewald and Z. Werb. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 221-233. [R]

Rozario, T. and D. W. DeSimone. 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* 341, 126-140. [R]

Shattil, S. J., C. Kim and M. H. Ginsberg. 2010. The final steps of integrin activa tion: the end game. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 288-300. [R]

Tamkun, J. W., D. W. DeSimone, D. Fonda, R. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz, and R. O. Hynes. 1986. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46: 271-282. [P]

Yurchenco, P. D. 2011. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3:a004911. [R]

Hücre-Hücre Etkileşimleri

Bergoffen, J., S. S. Scherer, S. Wang, M. O. Scott, L. J. Bone, D. L. Paul, K. Chen, M. W. Lensch, P. F. Chance, and K. H. Fischbeck. 1993. Connexin mutations in X-linked Charcot -Marie-Tooth disease. *Science* 262: 2039-2042. [P]

Elias, L. A, and A. R. Kriegstein. 2008. Gap junctions: multifaceted regulators of embryonic cortical development. *Trends Neurosci.* 31: 243-250. [R]

Green, K. J., and C. L. Simpson. 2007. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J. Invest Dermatol.* 127: 2499-2515 . [R]

Harris, T. J. C. and U. Tepass. 2010. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature Rev. Cell Mol. Biol.* 11: 502-514. [R]

Kragler, F. 2013. Plasmodesmata: intercellular tunnels facilitating transport of macromolecules in plants. *Cell Tissue Res.* 352: 49-58. [R]

Laird, D. W. 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* 394: 527-543. [R]

Lee, J. Y., and H. Lu. 2011. Plasmodesmata: the battleground against intruders. *Trends Plant Sci.* 16: 201-210. [R]

Lucas, W. J., B. K. Ham and J. Y. Kim. 2009. Plasmodesmata-bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends Cell Biol.* 19: 495-503. [R]

Nekrasova, O. and K. J. Green. 2013. Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol.* 23: 537-546. [R]

Niessen, C. M. 2007. Tight junctions / adherens junctions: basic structure and function. *J. Invest Dermatol.* 127: 2525-2532.[R]

Pokutta, S., and W. I. Weis. 2007. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 237-261. [R]

Rikitake, Y., K. Mandai and Y. Takai. 2012. The role of nectins in different types of cell-cell adhesion. *J. Cell Sci.* 125: 3713-3722 . [R]

Sotomayor, M., R. Gaudet and D. P. Corey. 2014. Sorting out a promiscuoussu perfamily: towards cadherin connectomics. *Trends Cell Biol.* 24: 524-536. [R]

Takeichi, M. 2014. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 397-410. [R]

van Steensel, M. A 2004. Gap junction diseases of the skin. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 131C: 12-19. [R]

Wei, C. J., X. Xu and C. W. Lo. 2004. Connexins and cell signaling in development and disease. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 811-838. [R]

KISIM IV

Hücre Regülasyonu

Bölüm 16 **Hücre Sinyal İletimi**

Bölüm 17 **Hücre Döngüsü**

Bölüm 18 **Hücre Ölümü ve Hücre Yenilenmesi**

Bölüm 19 **Kanser**

BÖLÜM 16

Hücre Sinyal İletimi

Sinyal İletimi Molekülleri ve Reseptörleri 601

G Proteinleri ve Siklik AMP Sinyal İletimi 611

Tirozin Kinazlar ve MAP Kinaz, PI 3-Kinaz ve Fosfolipaz C/Kalsiyum Yolakları ile Sinyal İletimi 619

Transkripsiyon Faktörleri ile Eşlenik Reseptörler 637

Sinyal İletimi Dinamikleri ve Ağları 641

Anahtar Deney

G Protein-Eşlikli Reseptörler ve Koku Tespiti 613

Moleküler Tıp

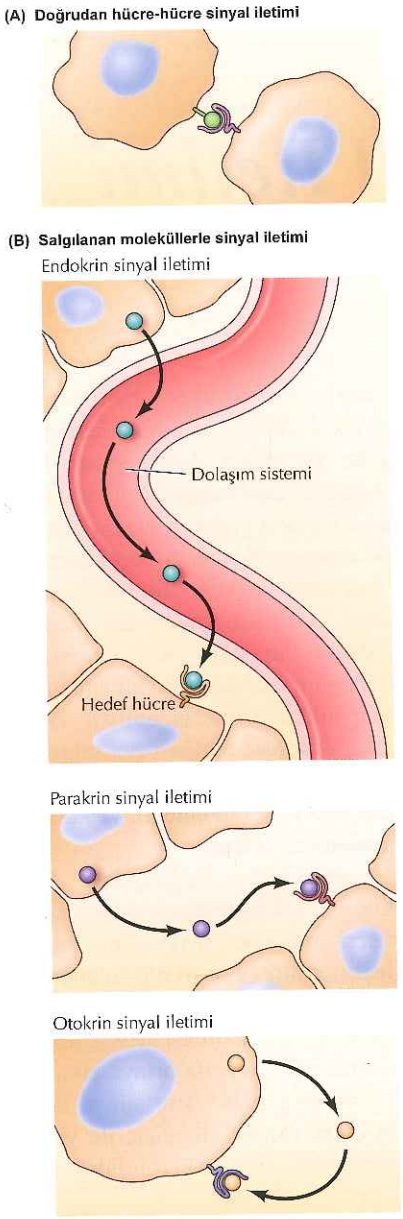
Kanser: Sinyal İletimi ve *ras* Onkogenleri 625

Tüm hücreler çevrelerinden sinyaller alır ve bu sinyallere yanıt verir. En basit bakteri bile yüksek konsantrasyonda glukoz ve amino asitler gibi besinlerin bulunduğu bölgeleri algılar ve onlara doğru yüzer. Çoğu bakteri ve tek hücreli ökaryotlar da diğer hücreler tarafından salgılanan sinyal moleküllerine yanıt vererek hücre-hücre haberleşmesi yapar. Örneğin, mayalar arasındaki döllenme sinyalleri bir hücre tarafından salgılanan peptidlerin, bir diğer hücrenin yüzeyindeki reseptörlere bağlanması ile iletilir. Ancak, çok hücreli organizmalarda hücre-hücre iletişimi gelişmişliğin en üst düzeyine ulaşmıştır. Prokaryot hücreler ve tek hücreli ökaryotlar çoğunlukla otonom iken, çok hücreli bitki ve hayvanların her bir hücresinin davranışı organizmanın bir bütün olarak gereksinimleri karşılaması için dikkatle düzenlenmiştir. Bu bir hücreden salgılanan ya da hücrenin yüzeyinde eksprese edilen veya salgılanan değişik sinyal iletimi moleküllerinin, bir diğer hücrede eksprese olan reseptörlere bağlanması ile gerçekleştirilir, böylece birçok tek hücrenin entegre ve koordine fonksiyonları ile insan kadar kompleks organizmalar oluşur.

Birçok sinyal iletimi molekülünün reseptörlerine bağlanması, hücre metabolizması, hareketi, çoğalması, sağkalımı ve farklılaşmasını içeren, hemen tüm hücre davranışlarını düzenleyen bir seri hücre içi reaksiyonu başlatır. Bundan dolayı bu yolakların moleküler bileşenlerinin ve nasıl düzenlendiğinin anlaşılması çağdaş hücre biyolojisindeki önemli araştırma alanlarından birisi olmuştur. Bu alana ilgi pek çok kanserin normal hücre çoğalması ve sağ kalımını kontrol eden sinyal iletimi yolaklarının bozulması sonucunda ortaya çıktığının saptanması ile daha da artmıştır. Gerçekten de bugünkü hücre sinyal iletimi mekanizmaları hakkındaki birikimlerimizin çoğu kanser hücreleri ile yapılan çalışmalardan gelmektedir ve bu da tıp ile hücre ve moleküler biyolojideki temel araştırmalar arasındaki verimli etkileşime çarpıcı bir örnektir.

Sinyal İletimi Molekülleri ve Reseptörleri

Çok hücreli organizmaların hücreleri arasındaki bilgi alışverişini, birçok farklı tipte molekül sağlar. Bu moleküllerin tamamı hedef hücreler tarafından eksprese edilen reseptörlerine bağlanan ligandlar olarak işlev görse de, sinyal iletimini sağlayan farklı tipteki moleküllerin yapı ve fonksiyonları arasında önemli farklılıklar vardır. Yapısal olarak, bitki ve hayvanlar tarafından kullanılan sinyal iletimi molekülleri, basit gazlardan proteinlere kadar değişen farklı karmaşıklık düzeyindedir. Bu moleküllerden bazıları sinyalleri uzun mesafeler boyunca taşırken, bazıları komşu hücreler arasındaki bilgiyi iletilerek bölgesel etki gösterir. Ek olarak, sinyal iletimi moleküllerinin hedef hücrelerindeki etki yolları farklıdır. Bazı sinyal iletimi molekülleri plazma zarından geçebilir ve sitoplazmadaki veya çekirdekteki hücre



Şekil 16.1 Hücre-hücre sinyal iletimi tipleri Hücre sinyal iletimi ya (A) doğrudan hücre-hücre teması yoluyla ya da (B) salgılanmış sinyal iletimi molekülleri aracılığıyla gerçekleşir. Endokrin sinyal iletiminde, hormonlar uzaktaki hedef hücrelerine dolaşım sistemi yoluyla taşınırlar. Parakrin sinyal iletiminde, bir hücreden salınan bir molekül komşu hedef hücreleri lokal olarak etkiler. Otokrin sinyal iletiminde, bir hücre ürettiği sinyal iletimi molekülüne kendisi yanıt verir.

içi reseptörlerine bağlanabilir, buna karşın çoğu reseptör hedef hücre yüzeyinde sergilenir. Bu bölümde ana sinyal iletimi molekülleri ve bunların etkileşime girdiği reseptör tipleri anlatılacaktır. Bu bölümdeki daha sonraki tartışmalar, hücre davranışlarını düzenleme fonksiyonu olan hücre yüzey reseptörlerinin etki mekanizmalarına odaklanacaktır.

Hücre-hücre sinyal iletimi tipleri

Hücre sinyal iletimi, ya bir hücrenin komşusu ile doğrudan etkileşimi ya da salgılanan sinyal iletim molekülleri ile gerçekleşir (Şekil 16.1). Doğrudan hücre-hücre (veya hücre-matriks) etkileşimleri tarafından gerçekleştirilen sinyal iletimi hayvan dokularındaki hücrelerin davranışlarının düzenlenmesinde kritik rol oynar. Örneğin, integrinler ve kadherinler (bir önceki bölümde anlatıldı) yalnızca hücre adhezyon molekülü olarak fonksiyon görmez, aynı zamanda komşu hücrelere ya da ekstraselüler matrikse bağlanan ve hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantılarına yanıt olarak hücre proliferasyonu ve sağ kalımını düzenleyen sinyal iletimi molekülleridir. Ek olarak, hücreler komşu hücrelerin yüzeyindeki sinyal iletimi molekülleri ile etkileşime giren çeşitli hücre yüzey reseptörleri eksprese eder. Bu gibi doğrudan hücre-hücre etkileşimleri aracılığı ile sinyal iletimi, embriyonik gelişim sırasında ve erişkin dokuların devamlılığının sağlanmasında görev alan farklı hücre tipleri arasındaki birçok etkileşimin düzenlenmesinde kritik rol oynar.

Salgılanmış moleküller ile sinyal iletiminin birçok farklı tipi, ilettiği sinyalin uzaklığı esas alınarak sıklıkla üç genel kategoride incelenir. **Endokrin sinyal iletiminde,** sinyal iletimi molekülleri (**hormonlar**) özelleşmiş endokrin hücrelerden sentezlenir ve dolaşım yoluyla taşınarak, uzak vücut bölgelerindeki hedef hücreler üzerinde etki gösterir. Yumurtalıklarda üretilen, kadın üreme sisteminin ve ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesini ve devamlılığını sağlayan bir steroid hormon olan östrojen bu konudaki klasik bir örnektir. Hayvanlarda hipofiz, tiroid, paratiroid, pankreas, adrenal bezler ve gonadları içeren endokrin bezler tarafından 50'den fazla farklı hormon üretilir.

Hormonların aksine, bazı sinyal iletimi molekülleri komşu hücrelerin davranışlarını lokal olarak etkiler. **Parakrin sinyal iletiminde,** bir hücreden salınan bir molekül komşu hedef hücreleri etkiler. Sinir hücreleri arasında sinapslarda sinyalleri taşıyan nörotransmiterlerin etkisi bu konuya örnek verilebilir. Son olarak, bazı hücreler kendi ürettikleri sinyal iletimi moleküllerine yanıt verir. Bu gibi **otokrin sinyal iletimine** önemli bir örnek, omurgalı bağışıklık sistem hücrelerinin yabancı antijenlere yanıtıdır. Belli bazı T lenfosit tipleri antijenik uyarıya yanıt olarak kendi çoğalmalarını uyaran bir büyüme faktörü sentezler, böylece o antijene yanıt veren T lenfosit sayısını artar ve bağışık yanıt amplifiye olur. Anormal otokrin sinyal iletiminin sıklıkla kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına katkıda bulunması da dikkate değerdir (Bkz. Bölüm 19). Bu durumda, bir kanser hücresi kendi yanıt verdiği bir büyüme faktörünü üretir, böylece kendisinin kontrolsüz çoğalmasını sürekli olarak uyarır.

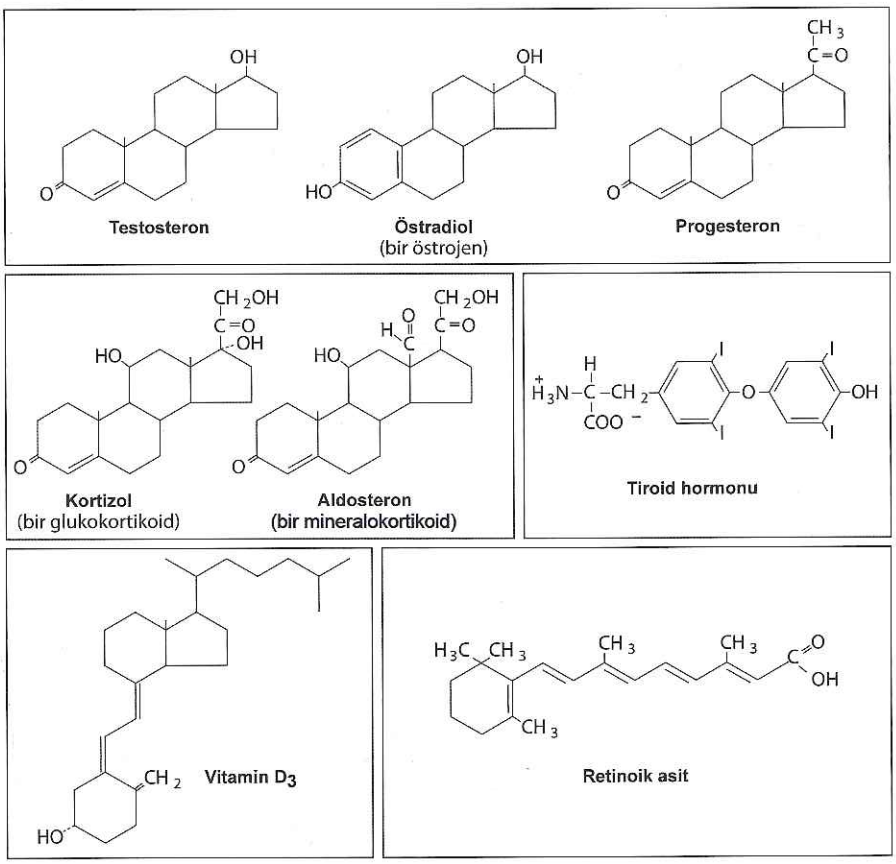
Steroid hormonlar ve nükleer reseptör süperailesi

Daha önce de belirtildiği gibi, bütün sinyal iletimi molekülleri hedef hücreleri üzerinde eksprese olan reseptörlerine bağlanarak etki gösterir. Pek çok durumda, bu reseptörler hedef hücre yüzeylerinde eksprese edilir, ancak bazı reseptörler sitozol veya nükleusta yerleşebilen hücre içi proteinlerdir. Bu hücre içi reseptörler plazma zarını doğrudan geçebilen, küçük hidrofobik sinyal iletimi moleküllerine yanıt verir. Tiroid hormonunu, vitamin D_3'ü ve retinoik asidi de içeren **steroid hormonlar,** bu grup sinyal iletimi moleküllerinin klasik örnekleridir (Şekil 16.2).

Steroid hormonların (testosteron, östrojen, progesteron, kortikosteroidler ve ekdizon dahil) tamamı kolesterolden sentezlenir. **Testosteron, östrojen** ve **progesteron** gonadlar tarafından üretilen cinsiyet steroidleridir. **Kortikosteroidler** adrenal bez tarafından üretilir. Bu grup, çok sayıda hücrede glukoz üretimini uyaran **glukokortikoidleri** ve böbrekte tuz ve su dengesini düzenleyen **mineralokortikoidleri** de içerir. **Ekdizon** larvadan erişkine metamorfozu tetikleyerek gelişimde anahtar rol oynayan bir böcek hormonudur. **Brasinosteroidler** hücre büyüme ve farklılaşmasını içeren çok sayıda gelişimsel süreci kontrol eden bitkiye özgü steroid hormonlardır.

Her ne kadar tiroid hormon, D_3 vitamini ve retinoik asid yapısal ve işlevsel olarak steroidlerden farklı iseler de, hedef hücrelerindeki genel etki

Animasyon 16.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a16.1
Salgılanmış Moleküller ile Sinyal İletimi Endokrin sinyal iletiminde, hormonlar özelleşmiş endokrin hücrelerden sentezlenir ve dolaşım yoluyla taşınarak, uzak vücut bölgelerindeki hedef hücreler üzerinde etki gösterir. Otokrin sinyal iletiminde ise bir hücre; kendi ürettiği sinyal iletimi molekülüne yine kendisi yanıt verir.

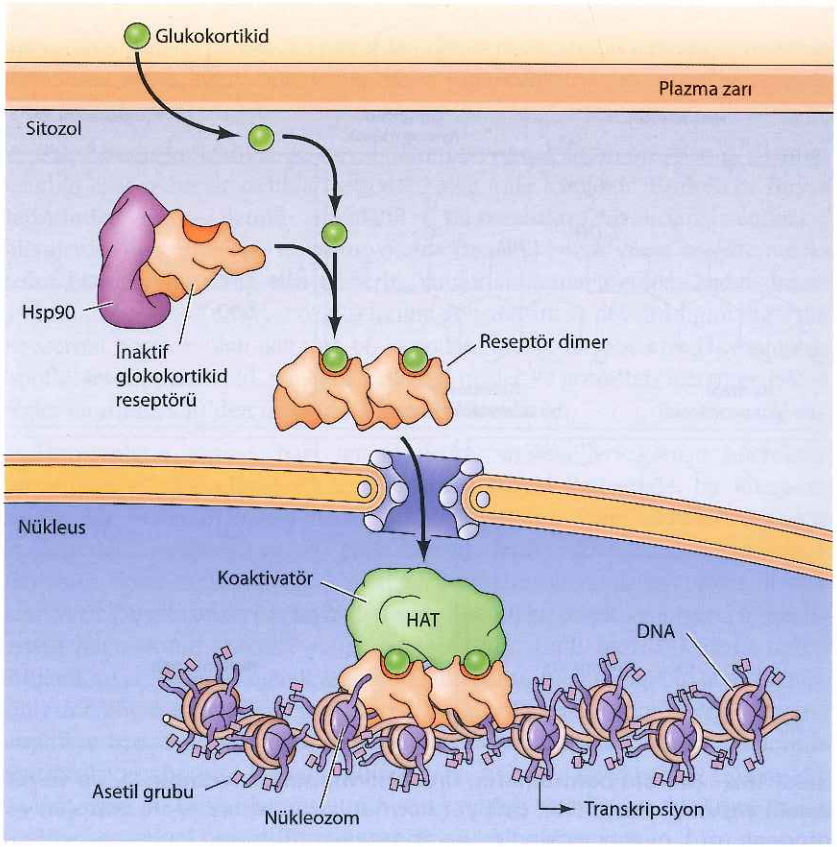


Şekil 16.2 Steroid hormonların, tiroid hormonunun, vitamin D_3'ün ve retinoik asidin yapısı Steroidler, cinsiyet hormonlarını (testosteron, östrojen ve progesteron), glukokortikoidleri ve mineralokortikoidleri içerir.

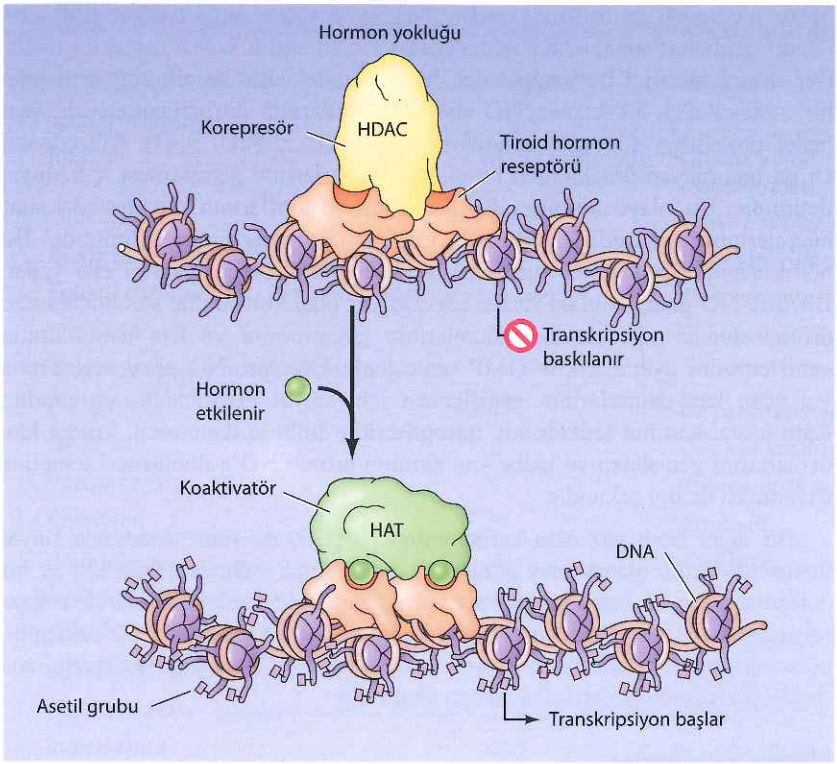
mekanizması aynıdır. **Tiroid hormon** tiroid bezinde tirozinden sentezlenir; metabolizmanın gelişimi ve düzenlenmesinde önemli rolleri vardır. **D_3 vitamini** Ca^{2+} metabolizmasını ve kemik gelişimini düzenler. Vitamin A dan sentezlenen **retinoik asit** ve ilişkili bileşikler **(retinoidler)** omurgalıların gelişiminde önemli roller oynar.

Hidrofobik özelliklerinden dolayı, steroid hormonlar plazma zarından difüzyon ile hücre içine girebilir. Tiroit hormonların plazma zarı boyunca geçişi taşıyıcı proteinler tarafından kolaylaştırılır. Bir kez hücre içine girince, steroidler, tiroid hormon, D_3 vitamini ve retinoik asid hormona yanıt veren hedef hücrelerde eksprese edilen hücre içi reseptörlerine bağlanır. **Nükleer reseptör süperailesi** olarak da bilinen bir protein ailesinin üyesi olan bu reseptörler; liganda bağlanma, DNA'ya bağlanma ve transkripsiyonel aktivasyon için bölgeler içeren transkripsiyon faktörleridir. Ligand bağlanması bu moleküllerin, hedef genlerinin represörü ya da aktivatörü olarak işlevini düzenler. Dolayısıyla steroid hormonlar ve ilişkili moleküller doğrudan gen ekspresyonunu düzenler.

Ligand bağlanması farklı reseptörler üzerinde değişik etkiler oluşturur. Nükleer reseptör ailesinin bazı üyeleri, hormonları olmadığında DNA'ya bağlanamaz. Örneğin, glukokortikoid reseptörü, hormon olmadığında Hsp90 şaperonlarına bağlanır (**Şekil 16.3**). Glukokortikoid bağlanması reseptörde bir konformasyonel değişikliği uyarır, bu değişiklik Hsp90'dan ayrılmasını, regülatör DNA dizilerine bağlanan ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eden reseptör dimerlerinin oluşumunu sağlar. Diğer bazı durumlarda, reseptör



Şekil 16.3 Glukortikoid etkisi Glukortikoidler plazma zarından geçer ve çekirdekteki glukortikoid reseptörüne bağlanır. Ligand olmadığında, reseptör sitoplazmada Hsp90'a bağlıdır. Glukortikoid bağlanması ile reseptör Hsp90'dan ayrılır ve reseptör dimerleri oluşur. Aktifleşmiş reseptörler nükleusa geçer, DNA'ya bağlanır ve histon asetiltransferaz (HAT) aktivitesi olan koaktivatörler ile etkileşime girerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır.



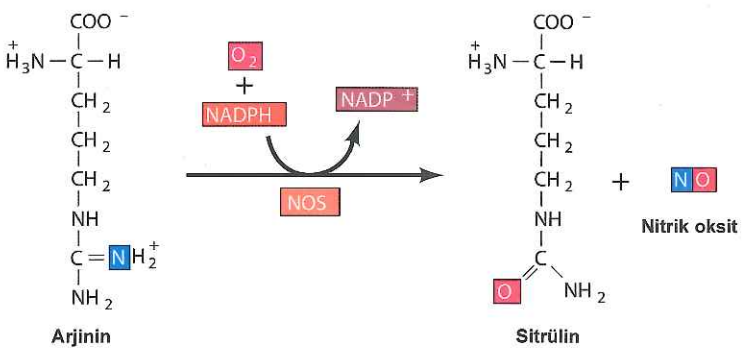
Şekil 16.4 Tiroid hormon reseptörü ile gen düzenlenmesi Tiroid hormon reseptörü hormon olsa da olmasa da DNA'ya bağlanır. Ancak hormon bağlanması reseptörün fonksiyonunu hedef gen transkripsiyonu için bir represörden bir aktivatöre değiştirir. Reseptör hormon olmadığı zaman histon deasetilaz (HDAC) aktivitesi olan bir korepresör ile bağlanır. Hormon varlığında, reseptör histon asetil transferaz (HAT) aktivitesi olan koaktivatör ile bağlanır.

hormon olsa da olmasa da DNA'ya bağlanır, fakat hormona bağlanması reseptörün transkripsiyonu düzenleyen bir molekül olarak aktivitesini değiştirir. Örneğin, hormon yokluğunda tiroid hormon reseptörü hedef genlerinin transkripsiyonunu baskılayan bir korepresör kompleksi ile etkileşimdedir (Şekil 16.4). Hormon bağlanması, reseptörün korepresörden çok koaktivatörü ile etkileşimi ile sonuçlanan ve tiroid hormonu tarafından-uyarılabilir genlerin transkripsiyonel aktivasyonuna yol açan bir konformasyonel değişimi uyarır.

Nitrik oksit ve karbonmonoksit

Basit bir gaz olan nitrik oksit (NO) sinir sistemi, bağışıklık sistemi ve dolaşım sistemi için önemli bir sinyal iletim molekülüdür. Steroid hormonlar gibi, NO de, hedef hücrelerinin plazma zarından doğrudan difüzyonla hücre içine girebilir. Bununla birlikte, NO etkisinin moleküler temeli, steroidlerin etkisinden farklıdır; NO transkripsiyonu düzenleyen bir reseptöre bağlanmak yerine, hücre içi hedef enzimlerin aktivitesini değiştirir.

Nitrik oksid arjinin amino asidinden nitrik oksid sentaz enzimi tarafından sentezlenir (Şekil 16.5). Bir kez sentezlenince, NO hücreden dışarıya çıkar ve komşu hücreleri bölgesel olarak etkileyebilir. NO etkisi, çok kararsız olması ve yarılanma ömrünün yalnızca birkaç saniye sürmesi nedeniyle bu gibi lokal etkiler ile sınırlıdır. NO'in ana



Şekil 16.5 Nitrik oksid sentezi Nitrik oksid sentaz (NOS) enzimi arjininden nitrik oksid oluşumunu katalizler.

hücre içi hedefi **guanilil siklazdır**. NO bu enzimin aktif merkezindeki bir "hem" grubuna bağlanır, bir ikinci mesajcı olan **siklik GMP** sentezini uyarır (bir **ikinci mesajcı** bir reseptörden hücre içindeki bir hedefe sinyal aktaran bir moleküldür). Ek olarak, NO sistein kalıntılarının nitrozillenmesi ile bazı hedef proteinleri doğrudan modifiye edebilir (Bkz. Şekil 9.43). NO etkisini en iyi tanımlayan örneklerden birisi, kan damarlarının genişlemesi için sinyal iletimidir. Bu olaydaki birici basamak, kan damarlarının duvarındaki sinir hücrelerinin sonlarından, asetilkolin gibi bir nörotransmiterin salınımıdır. Bu nörotransmiterler endotel hücreleri üzerinde NO sentezini uyarıcı etki yapar. Böylece NO guanil siklazı aktive edeceği yer olan komşu düz kas hücrelerine difüze olur ve sonuçta kas hücrelerinin gevşemesini ve kan damarlarının genişlemesini uyaran siklik GMP sentezlenir. Örneğin, NO penil ereksiyona yol açan kan damarlarının genişlemesi için sinyal iletiminden sorumludur. Kalp hastalıklarının tedavisinde nitrogliserinin tıbbi kullanımının, kroner kan damarlarını genişleten ve kalbe kan akımını artıran NO'e dönüşmesi temeline dayanması da ilgi çekicidir.

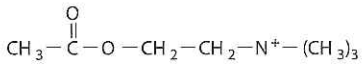
Bir diğer basit gaz olan karbonmonoksit (CO) de sinir sisteminde sinyal iletimi molekülü olarak işlev görür. CO, NO ile çok yakından ilişkilidir ve bir nörotransmiter ve kan damarlarının genişlemesinde mediyatör olarak benzer roller oynadığı görülmektedir. Beyin hücrelerinde CO sentezi, NO'deki gibi, nörotransmiterler tarafından uyarılır. Ek olarak CO sinyal iletiminin ana fizyolojik hedefi olan guanilat siklazı uyarabilir.

Nörotransmiterler

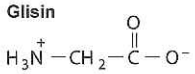
Nörotransmiterler nöronlar arasında veya bir nörondan diğer tiplerdeki hedef hücrelere (kas hücreleri gibi) sinyaller taşır. Asetilkolin, glisin, glutamat, dopamin, epinefrin (adrenalin), nörepinefrin, serotonin, histamin ve γ-aminobütirik asit (GABA)'nın da içinde yer aldığı farklı bir küçük hidrofilik moleküller grubudur (**Şekil 16.6**). Sinirsel ileticilerin salınımı, bir aksiyon potansiyelinin bir nöronun sonuna ulaşımı ile sinyallenir (Bkz. Şekil 14.21). Böylece sinirsel ileticiler sinaptik aralığın içine difüze olur ve hedef hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanır. Bazı nörotransmiterler hormonlar olarak da görev alabilir. Örneğin epinefrin, hem bir nörotransmiter, hem de adrenal bezler tarafından üretilen ve kas hücrelerinde glikojen yıkım sinyali olan bir hormon olarak fonksiyon görür.

Sinirsel ileticiler hidrofilik moleküller olduğundan, hedef hücrelerin plazma zarından geçemez. Bu nedenle, steroid hormonların ve NO veya CO'in aksine, nörotransmiterler hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak etki gösterir. Çoğu sinirsel iletici reseptörleri, 14. bölümde tartışılan asetilkolin reseptörü gibi (Bkz. Şekil 14.22), ligand-kapılı iyon kanallarıdır. Sinirsel ileticilerin reseptörlerine bağlanması iyon kanallarının açılmasını sağlayan bir konformasyonel değişikliği uyarır, bu durum hedef hücre içinde iyon akışının değişmesi ile sonuçlanır. Diğer nörotransmiter reseptörleri, hücre yüzey reseptörleri ile çeşitli hücre içi yanıtlar arasındaki bağlantıyı sağlayan ana sinyal iletimi molekül gruplarından birisi olan (bu bölümde daha sonra tartışılacak), G proteinleri ile birlikte çalışır. Sinirsel iletici reseptörlerinde, ilişkili G proteinleri sıklıkla iyon kanallarını düzenlemede rol oynar.

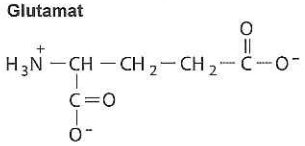
Asetilkolin



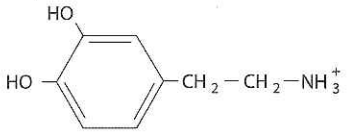
Glisin



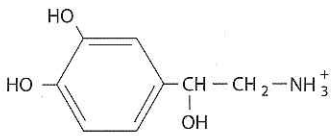
Glutamat



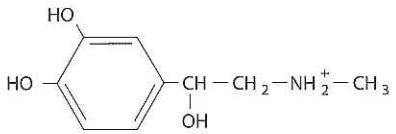
Dopamin



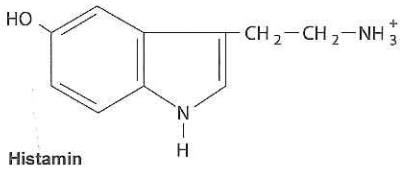
Norepinefrin



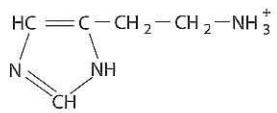
Epinefrin



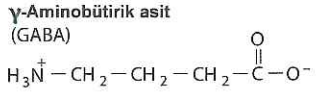
Serotonin



Histamin



γ-Aminobütirik asit (GABA)



Şekil 16.6 Sinirsel ileticilerin genel yapısı Nörotransmiterler hücre yüzey reseptörlerine bağlanan hidrofilik moleküllerdir.

Tablo 16.1 Bazı Peptid Hormonlar, Nöropeptidler ve Büyüme Faktörleri

Sinyal iletimi molekülü	Boyutu [a]	Etkileri [b]
Peptid Hormonlar		
İnsülin	A = 21, B = 30	Glukoz alımının düzenlenmesi, hücre çoğalmasının uyarılması
Glukagon	29	Glukoz sentezinin uyarılması
Büyüme Hormonu	191	Genel büyüme uyarımı
Folikül stimüle edici hormon (FSH)	α = 92, β = 118	Oositlerin ve over foliküllerinin büyümesinin uyarılması
Prolaktin	198	Süt üretiminin uyarılması
Nöropeptidler ve nörohormonlar		
P maddesi	11	Duyu sinaps geçişi
Oksitosin	9	Düz kas kasılmasının uyarımı
Vazopresin	9	Böbreklerde su geri emiliminin uyarılması
Enkefalin	5	Analjezik
β-Endorfin	31	Analjezik
Büyüme faktörleri		
Sinir büyüme faktörü (NGF)	118	Sinir hücrelerinin farklılaşması ve sağ kalımı
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	53	Birçok farklı tipteki hücrenin çoğalması
Platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF)	A = 125, B = 109	Fibroblastların ve diğer bazı hücre tiplerinin çoğalması
İnterlökin-2	133	T lenfositlerin proliferasyonu
Eritropoietin	166	Kırmızı kan hücrelerinin gelişimi

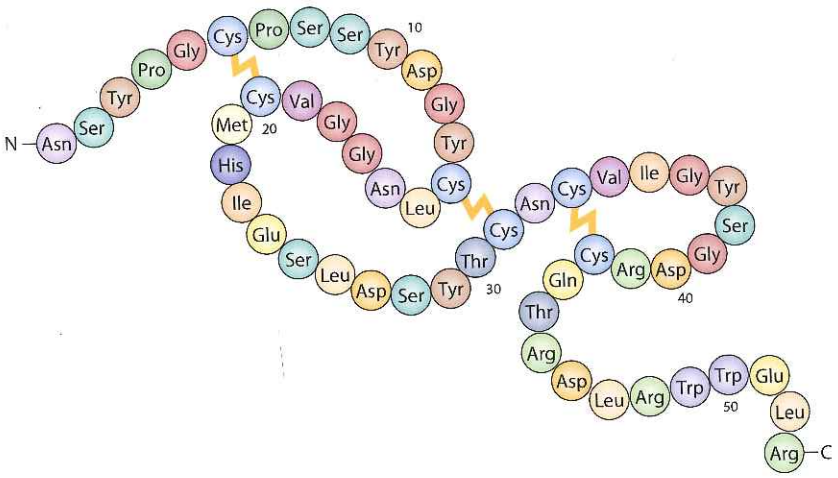
[a] Boyut, amino asit sayısı anlamına gelmektedir. Bazı hormonlar ve büyüme faktörleri iki farklı polipeptid zinciri içerirler, bunlar A ve B, veya α ve β olarak gösterilmiştir.
[b] Bu hormon ve büyüme faktörlerinin çoğunun burada tanımlanmayan ek bazı etkileri de vardır.

Peptid hormonlar ve büyüme faktörleri

Hayvanlarda en geniş çeşitlilik gösteren sinyal iletimi molekülleri, boyutları birkaç amino asit ile yüzden fazla amino asit arasında değişen peptidlerdir. Bu grup sinyal iletimi molekülleri peptid hormonları, nöropeptidleri ve bir dizi farklı polipeptid büyüme faktörlerini içerir (Tablo 16.1). **Peptid hormonlar** için en iyi bilinen örnekler; insülini, glukagonu ve hipofiz bezi tarafından üretilen hormonları (büyüme hormonu, folikül-stimüle edici hormon, prolaktin ve diğerleri) içerir.

Nöropeptidler bazı nöronlardan, bir önceki bölümde bahsedilen küçük-moleküllü nörotransmiterler yerine salınır. Bu peptidlerin **enkefalinler** ve **endorfinler** gibi bazıları, sinapslarda nörotransmiter olarak fonksiyon görmeleri yanı sıra, uzak hücreler üzerinde etkili **nörohormonlar** olarak da işlev görürler. Enkefalinler ve endorfinler merkezi sinir sisteminde ağrı yanıtını azaltan doğal analjezikler olarak aktivite göstermeleri nedeniyle çok yaygın olarak çalışılmaktadır. İlaç bağımlılığı çalışmaları sırasında keşfedilen bu moleküller, beyin hücreleri yüzeyindeki morfinin bağlandığı reseptörlere bağlanan, doğal olarak oluşan bileşiklerdir.

Polipeptid **büyüme faktörleri** hayvan hücrelerinin çoğalma ve farklılaşmasını kontrol eden çok sayıda sinyal iletimi molekülünü içermektedir. Bu faktörleden ilki (**sinir büyüme faktörü** ya da **NGF**) 1950'lerde Rita-Levi Montalcini tarafından keşfedilmiştir. NGF, **nörotrofinler** olarak adlandırılan, nöronların gelişimini ve sağ kalımını düzenleyen bir polipeptid ailesinin



Şekil 16.7 Epidermal büyüme faktörünün (EGF) yapısı EGF, 53 amino asitten oluşan bir polipeptid zinciridir. Sistein birimleri arasında disülfid bağları gösterilmiştir. (G.Carpenter ve S.Cohen, 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 48:193).

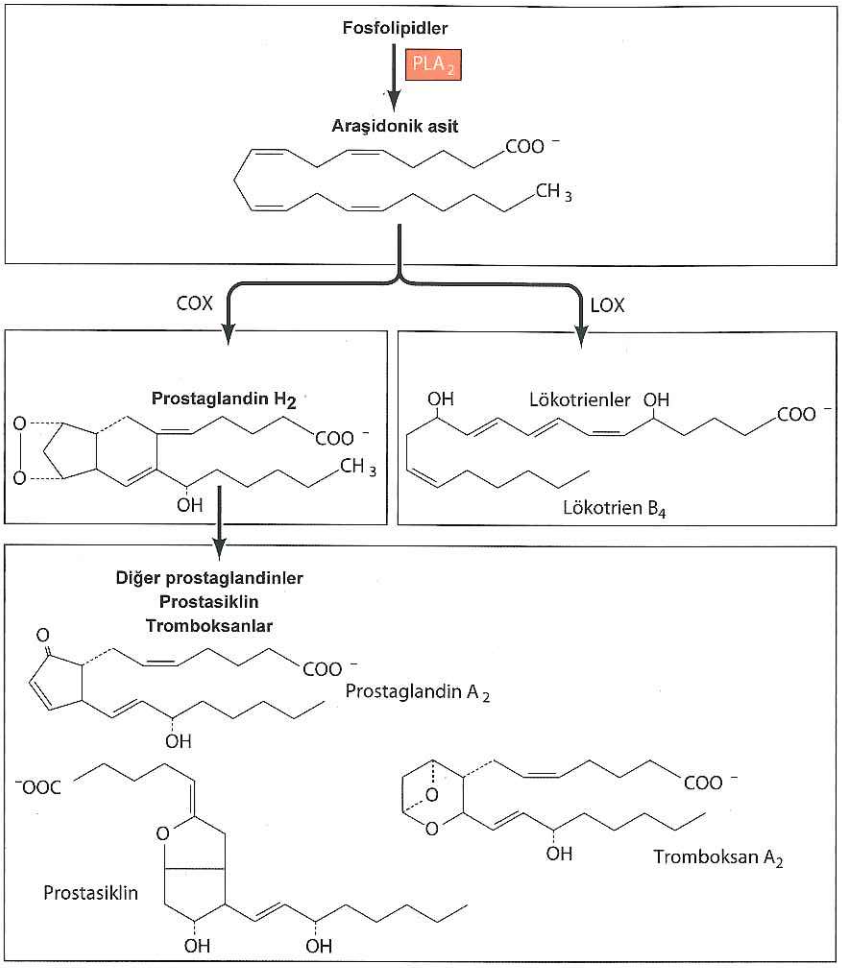
üyelerinden biridir. NGF deneyleri sürecinde, Stanley Cohen, rastlantısal olarak hücre çoğalmasını uyaran ilişkisiz olan bir faktörü (**epidermal büyüme faktörü** ya da **EGF** olarak adlandırılan) keşfetti. EGF, 53-amino-asitlik bir polipeptid olan (Şekil 16.7), hem embriyonik gelişim sırasında hem de erişkin organizmada hayvan hücrelerinin proliferasyonunu kontrol etmede kritik rollere sahip büyük bir dizi büyüme faktörünün prototipi oldu.

Platelet-kökenli büyüme faktörünün (PDGF) yara iyileşmesindeki aktivitesi ile büyüme faktörlerinin etkilerini gösteren iyi bir örnek elde edildi. PDGF kanda trombositlerde depolanmakta ve yara bölgesindeki kan pıhtılaşması sırasında salınmaktadır. PDGF salındığı zaman pıhtı yakınındaki fibroblastların proliferasyonunu ve hareketini uyarmakta, böylece hasarlı dokunun yenilenmesine katkıda bulunmaktadır. PDGF ayrıca çeşitli embriyonik dokuların gelişiminde önemli roller oynar. Bir diğer büyük polipeptid büyüme faktörü grubu (**Sitokinler** denilen ve eritropoietin ve interlökin-2'yi içeren) üyeleri, kan hücrelerinin gelişim ve farklılaşmasını düzenler ve bağışık yanıt sırasında lenfositlerin aktivitesini kontrol eder. Diğer polipeptid büyüme faktörleri **(zarlara-tutunmuş büyüme faktörleri)** ekstraselüler sıvılara salınmaktan çok plazma zarı ile bağlantılı kalır, bundan dolayı doğrudan hücre-hücre etkileşimleri sırasında spesifik olarak sinyal iletimi molekülleri olarak fonksiyon görür.

Peptid hormonlar, nöropeptidler ve büyüme faktörlerinin hedef hücrelerinin plazma zarlarını geçme yetenekleri yoktur, bu yüzden etkilerini, bu bölümde daha sonra da bahsedileceği gibi, hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak gösterir. Polipeptid büyüme faktörlerinin hücre çoğalması kontrolündeki kritik rollerinden de tahmin edilebileceği gibi, büyüme faktörü sinyal iletimindeki anormallikler pek çok kanser tipini de içeren çok sayıda hastalığın temel nedenidir. Örneğin, EGF reseptörünün anormal ekspresyonu pek çok insan kanserinin gelişiminde önemli bir faktördür ve EGF reseptörünün inhibitörleri kanser tedavisinde umut verici ajanlardır (Bkz. Bölüm 19).

Ökosanoidler

Steroid hormonların aksine birçok lipid, hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak



Şekil 16.8 Ökosanoidlerin sentezi ve yapısı Ökosanoidler prostoglandinleri, prostasiklini, tromboksanları ve lökotrienleri içerir. Araşidonik asit fosfolipidlerin fosfolipaz A_2 (PLA_2) tarafından katalizlenmiş hidrolizi sonucunda sentezlenir. Araşidonik asit daha sonra iki alternatif yolak aracılığı ile metabolize edilebilir; bir yolak (siklooksijenaz [COX] tarafından başlatılır) prostoglandinler, prostasiklin ve tromboksanların oluşumunu sağlarken, diğer yolak (lipoksijenaz [LOX] tarafından başlatılır) lökotrienlerin sentezine neden olur.

etki gösteren sinyal iletimi molekülleri olarak iş görür. Bu moleküllerin en önemlileri, **ökosanoidler** olarak adlandırılan **prostoglandinler, prostasiklinler, tromboksanlar** ve **lökotrienleri** içeren bir lipid ailesidir (**Şekil 16.8**). Ökosanoidler hızla yıkılabilmeleri nedeniyle otokrin ya da parakrin sinyal ileti yolaklarında lokal etkilidir. Hedef hücrelerinde kan trombositlerinin kümelenmesi, yangı ve düz-kas kasılmasını da içeren çok sayıda yanıtı uyarır.

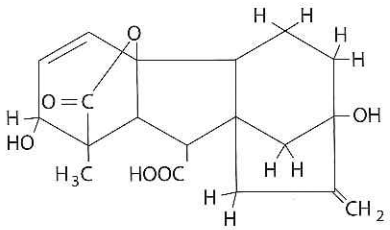
Tüm ökosanoidler fosfolipidlerden yapılmış olan araşidonik asitten sentezlenir. Prostoglandinlerin, prostasiklinin ya da tromboksanların sentezindeki yolakta birinci basamak, araşidonik asitin prostoglandin H_2, ye dönüşümüdür. Bu reaksiyonu katalizleyen enzim (siklooksijenaz or COX) aspirinin ve diğer nonsteroid anti-inflamatuar ilaçların (NSAIDs) hedefidir. Aspirin

prostoglandinlerin sentezini inhibe ederek inflamasyon ve ağrıyı azaltır. Aspirin aynı zamanda tromboksan sentezini inhibe ederek trombosit kümelenmesini ve kan pıhtılaşmasını azaltır. Bu aktivitelerinden dolayı, inmeden korunmak için sıklıkla günlük düşük dozda aspirin önerilir. Ek olarak, aspirinin ve diğer NSAID ajanların hem hayvan modellerde hem de insanlarda kolon kanseri sıklığını, büyük olasılıkla hücre proliferasyonunu uyaran ve kanser gelişimini başlatan prostoglandinlerin sentezini baskılayarak azalttığı bulunmuştur. Siklooksijenazın iki formunun olması önemlidir: COX-1 ve COX-2. COX-1'in esas olarak prostaglandinlerin normal fizyolojik üretiminden, COX-2'nin ise enflamasyon ve hastalıkla ilişkili olarak artan prostaglandin üretiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak pek çok kanser, tümör proliferasyonuna katkıda bulunabilecek olan yüksek düzeyde COX-2 eksprese eder. Sonuç olarak, COX-2 seçici inhibitörleri, bu tür ilaçların daha etkili olduğu ve hem COX-1'i hem de COX-2'yi inhibe eden aspirin veya geleneksel NSAID'lerden daha az yan etkiye sahip olduğu mantıksal açıklamasına dayanılarak geliştirilmiştir. Bununla birlikte, COX-2 inhibitörleri halen, kullanımlarını sınırlayan artmış kardiyovasküler hastalık riski de dahil olmak üzere ciddi yan etkiler ile ilişkilidir.

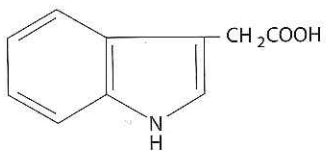
Bitki hormonları

Bitki büyümesi ve gelişimi steroidler, peptid hormonları ve **bitki hormonları** olarak adlandırılan küçük bir grup molekül tarafından düzenlenir. Bu moleküllerin bitkideki düzeyleri ışık veya enfeksiyon gibi çevresel faktörler tarafından modifiye edilir, böylece çevresel sinyaller, bitkinin farklı bölgelerindeki dokulardaki yanıtları koordine eder.

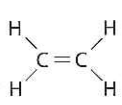
Bitki hormonları klasik olarak beş ana gruba ayrılır: **giberellinler, oksinler, etilen, sitokininler** ve **absisik asit** (Şekil 16.9). İlk bitki hormonu olarak tanımlanan oksinin keşfine öncülük eden deneyler 1880'lerde Charles Darwin tarafından gerçekleştirilmiştir. Oksinin etkilerinden biri, hücre duvarını zayıflatarak bitki hücresinin uzamasını uyarmasıdır (Bkz. Şekil 15.8). Ek olarak, oksinler, bitki gelişiminin hücre bölünmesi ve farklılaşmasını da içeren pek çok diğer yönünü de düzenler. Diğer bitki hormonları benzer bir şekilde hedef hücreleri üzerinde kök uzaması (giberellinler), meyve olgunlaşması (etilen), hücre bölünmesi (sitokininler) ve uyku halinin başlamasını (absisik asit) da içeren çok çeşitli etkiler gösterirler. Son zamanlardaki çalışmalar, beş klasik bitki hormonuna ek olarak, daha önceki kısımlarda anlatıldığı gibi, nitrik oksit



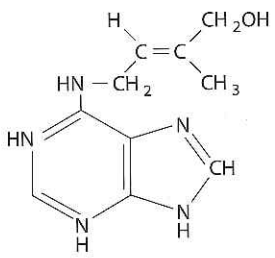
Giberellik asit
(bir giberellin)



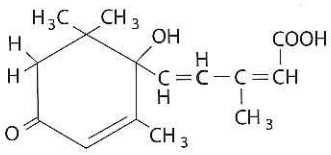
İndol-3-asetik asit
(bir oksin)



Etilen

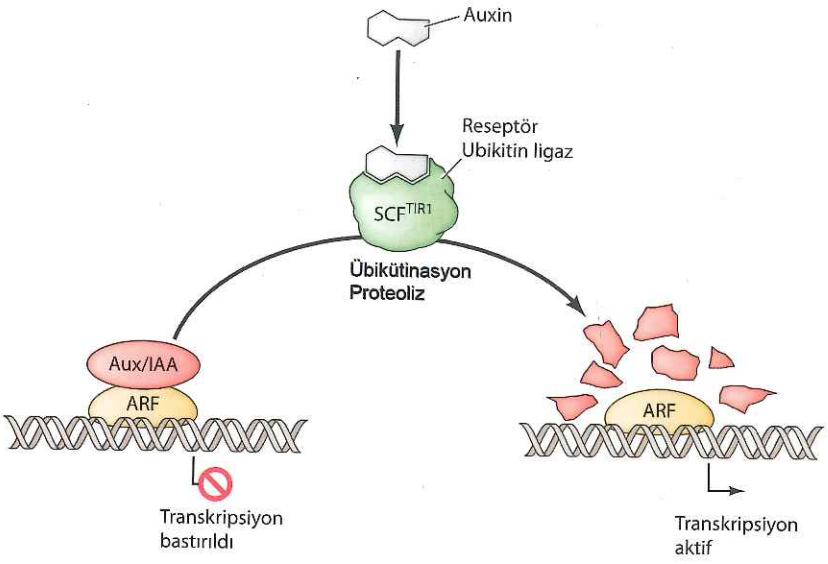


Zeatin
(bir sitokinin)



Absisik asit

Şekil 16.9 Bitki hormonları Beş klasik bitki hormonunun yapıları gösterilmiştir.



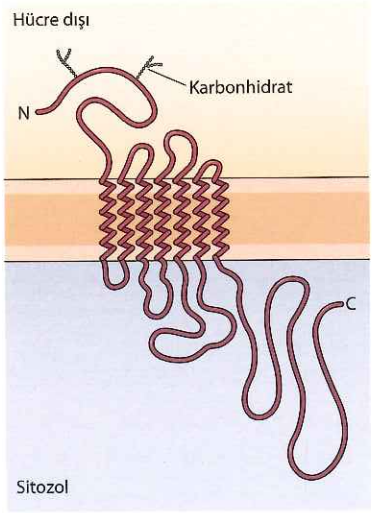
Şekil 16.10 Oksin sinyal iletimi Oksin olmadığında (sol), oksin-ilişkili genlerin promotörleri bir korepresör (Aux/IAA) ile ilişkili olan transkripsiyon faktörü (ARF) ile bağlıdır. Oksin varsa übikütin ligaz aktivitesine sahip (SCF^{TIR1}) ve Aux/IAA'nın übikütinlenmesini ve proteolizini uyaran reseptörüne bağlanır. ARF daha sonra oksin-uyarılmış genlerin transkripsiyonunu aktive eder.

ve brassinosteroid adı verilen bitki steroid hormonları da dahil olmak üzere, bitkilerde hormon olarak çalışan çeşitli başka bileşikler tanımlamıştır.

Etilen, sitokininler ve brassinosteroidler gibi bazı bitki hormonları tarafından tetiklenen sinyal yolakları, protein kinazların aktivasyonu gibi hayvan hücrelerinde korunan mekanizmaları kullanır (Bkz. Şekil 9.41). Oksin ve giberellin gibi diğer bitki hormonları, bitkilere özgü protein yıkımı aktivasyonunu içeren sinyal yolaklarını uyarır (**Şekil 16.10**). Örneğin, oksin übikütin ligaz ile ilişkili bir reseptöre bağlanarak ve onu aktive ederek gen ekspresyonunu kontrol eder (Bkz. Şekil 9.46). Oksin yokluğunda, oksin tarafından düzenlenen genlere bir korepresör (Aux/IAA) ile ilişkili olan bir transkripsiyon faktörü (oksin yanıt faktörü veya ARF) bağlanmıştır. SCF^{TIR1} übikütin ligazın oksin tarafından uyarılması, Aux/IAA korepresörünün yıkımına neden olarak ARF'ın hedef genlerin transkripsiyonunu aktif hale getirmesine izin verir.

G Proteinleri ve Siklik AMP Sinyal İletimi

Hücre-hücre sinyal iletiminden sorumlu çoğu ligand (nörotransmiterler, peptid hormonlar ve büyüme faktörleri dahil) hedef hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlere bağlanır. Dolayısıyla, hücre-hücre sinyal iletimini anlamada en önemli dürtülerden biri, hücre yüzey reseptörlerine ligand bağlanması ile başlatılan sinyal ileti mekanizmalarının aydınlatılmasıdır. Bölüm 14'te tartışıldığı gibi, bazı nörotransmiter reseptörler plazma zarından iyon geçişini doğrudan kontrol eden ligand kapılı iyon kanallarıdır. Peptid hormonların ve büyüme faktörlerinin reseptörlerini de içeren diğer hücre yüzey reseptörleri ise hücre içi enzimlerin aktivitelerini düzenleyerek etki gösterir. Bu enzimler reseptörden aldıkları sinyalleri, bir dizi ek hücre içi hedefe iletir ve bu sürece **hücre içi sinyal iletimi** denir. Bu tür sinyal iletim yolaklarının hedefleri



Şekil 16.11 G proteini-eşlikli reseptörlerin yapısı G proteini eşlikli reseptörler zarı yedi kez geçen α heliksleri ile tanımlanır.

sıklıkla, gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerini de içerir. Bu yüzden, ligandın hücre yüzeyindeki bir reseptöre bağlanması, sonuçta hedef hücre nükleusuna ulaşarak gen ekspresyon programlarını değiştiren bir hücre içi reaksiyonlar zincirini başlatır. Bu bölümün bu ve daha sonraki kısımlarında, ana hücre yüzeyi reseptörlerinin fonksiyonları ile bu reseptörler ile ilişkili sinyal ileti yolakları tartışılacaktır.

G proteinleri ve G proteini-eşlikli reseptörler

Hücre yüzey reseptörlerinin en geniş ailesi, sinyalleri hücre içi hedeflerine, **G proteinleri** olarak adlandırılan guanin nükleotid-bağlayan proteinler aracılığıyla iletir. Çoğu hormonun ve nörotransmiterin reseptörlerini de içeren binden fazla bu tip **G proteini eşlikli reseptör** tanımlanmıştır. Ek olarak, koku alma, görme ve tat almadan sorumlu çok sayıda reseptör de G proteini-eşlikli reseptör ailesi içindedir.

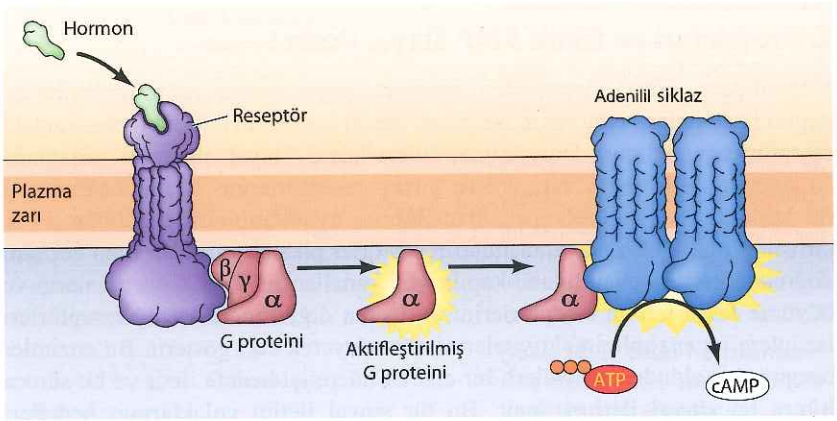
G proteini-eşlikli reseptörler, yapısal ve fonksiyonel olarak ilintili ve zarı yedi kez geçen α-heliks yapısı ile tanımlanan proteinlerdir (Şekil 16.11). Bu reseptörlerin ekstraselüler bölümlerine ligandlarının bağlanması, reseptörün sitozoldeki bölgesinin, plazma zarının iç yüzeyine bağlı bir G proteinini aktifleştirmesini sağlayan bir konformasyon değişikliğine neden olur. Aktifleştirilen G proteini daha sonra reseptörden ayrılır ve sinyali bir hücre içi hedefe taşır. Bu hedef bir enzim veya bir iyon kanalı olabilir.

G proteinleri, hedef hücrelerinde **siklik AMP (cAMP)** sentezini düzenleyen hormonlarla (epinefrin gibi) yapılan çalışmalar sonucunda keşfedildi. Bu bölümde daha sonra da tartışılacağı gibi, cAMP çok sayıda farklı hormona hücresel yanıtı düzenleyen önemli bir ikinci mesajcıdır. Martin Rodbell ve meslektaşları 1970'lerde **adenilil siklazın** (cAMP oluşumundan sorumlu enzim) hormonal uyarımı için GTP'nin gerekli olduğunu gözlemlediler. Bu bulgu, adenilil siklaz aktivasyonu için aracı bir molekül olarak bir guanin nükleotid-bağlayan proteinin (yukarıda bahsedilen G proteini) keşfine zemin hazırladı (Şekil 16.12). O zamandan günümüze, ekstraselüler sinyallere yanıt olarak birçok farklı hücre içi hedefin aktivitesini düzenleyen fizyolojik değiştiriciler olarak rol oynayan bir dizi G proteini bulundu.

Animasyon 16.2
sites.sinauer.com/cooper7e/a16.2
Sinyal İletimi Hücre yüzeyi reseptörlerinin en büyük ailesi, GTP'ye bağlanarak efektör proteinleri aktifleştiren G proteinlerini aktive eden sinyalleri hücre içine iletir.

Bilgi İçin

Köpeklerde insanlardakinin yaklaşık üç katı kadar fonksiyonel koku reseptörü kodlayan gen bulunur.



Şekil 16.12 Adenilil siklazın hormonlar ile aktivasyonu Hormonun bağlanması reseptörlerin bir G proteini ile etkileşimini başlatır. Aktive edilen G proteininin a alt birimi reseptörden ayrılır ve adenilil siklazı uyarır, bu da ATP'nin cAMP'ye dönüşümünü katalizler.

Anahtar Deney

G Protein-Eşlikli Reseptörler ve Koku Tespiti

Linda Buck and Richard Axel
Columbia University, NewYork

Cell, 1991, Volume 65, pages 175-187

Bağlam

Koku hissi hayvanların çevrelerini algıladıkları temel sistemlerden biridir. Burundaki periferik nöronlar binlerce farklı çeşit koku molekülünü fark edip sinyalleri bu bilginin işlendiği beyne aktarır. Koku hissini moleküler düzeyde anlayabilmek için koku yayan moleküllerin belirlenmesinden sorumlu olfaktör nöronların reseptörlerini belirlemek gerekiyordu. 1991 yılında Linda Buck ve Richard Axel koku algılama ve tanımadan sorumlu büyük bir G protein-eşlikli reseptör ailesi tanımladılar.

Önceki çalışmalar koku moleküllerinin olfaktör nöronlardaki sillerde bulunan reseptörler tarafından tanındığını gösterdi. Sıçan olfaktör nöronlarından izole edilmiş sillerin farklı koku yayıcılara maruz bırakılmasının adenilil siklazın uyarılmasına ve siklik AMP (cAMP)'nin yükselmesine neden olduğu gösterildi. Ayrıca bu koku yayıcılarca uyarılmış cAMP artışlarının GTP varlığına bağlı olduğunun bulunması koku yayıcı moleküllerin adenilil siklazı uyaran G protein-eşlikli reseptörleri aktive ettiğini akla getirdi. Artan cAMP daha sonra olfaktör nöronlarda plazma zarında bulunan Na^+ kanallarını açarak sinir impulsunu başlattı.

Buck ve Axel, koku reseptörlenin G protein-eşlikli reseptör süperilesi üyeleri oldukları hipotezine dayanarak bu reseptörleri kodlayan genlerin moleküler klonlarını izole etmeye koyuldular. Deneylerindeki başarıları yalnızca bu hipotezi doğrulamakla kalmadı, aynı zamanda koku ayırt etmenin moleküler esasını anlamanın temelini sağladı.

Deneyler

Buck ve Axel'in koku reseptörlerinin genlerini klonlama yaklaşımı üç varsayım üzerine kurulu idi. İlk olarak, koku reseptörleri G protein-eşlikli reseptör süperailesi üyeleri olup diğer aile üyeleri ile korunmuş dizileri paylaşıyordu. İkincisi, koku reseptörlerinin kendileri çok sayıda koku yayıcının belirlenmesi için gereken büyük bir aileydi. Ve üçüncüsü, bu reseptörler yalnızca olfaktör nöronlarda ekprese ediliyordu.

Bilinen G protein-eşlikli reseptörlerin korunmuş dizilerine karşılık gelen oligonükleotid primerleri, olfaktör nöronların mRNA'larını ters transkripsiyon ve onu izleyen PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltmak için kullanıldı (Bkz. Şekil 4.22). Olfaktör nöronlarda yüksek sayıda G protein-eşlikli reseptörün ekprese edilmesi ile tutarlı olarak, bu deneylerde çok yüksek sayıda PCR parçası elde edildi. Çoğaltılan PCR parçaları daha sonra plasmid vektörleri içine klonlandı ve 18 farklı cDNA klonu daha ileri karakterizasyonlar için izole edildi. Bu klonların Northern blotlarda prob olarak kullanımı homolog mRNA'ların olfaktör nöronlarda ekprese edildiğini ancak beyin, kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, ovaryum, retina ve dalak dahil bazı diğer hücrelerde

Linda Buck

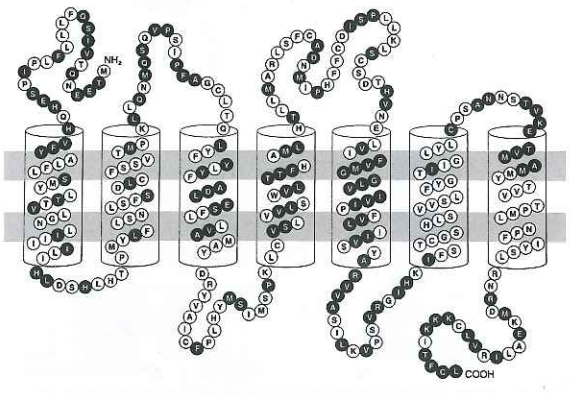
Richard Axel

Fotoğrafı Sağlayan: Linda Buck: Roland Morgan/Fred Hutchinson Kanser Araştırma Merkezi; Richard Axel: Don Hamerman/Columbia Üniversitesi Tıp Merkezi

ekprese olduğunu gösterdi. 10 tamamlanmış klonun nükleotid dizileri bunların G protein-eşlikli reseptörlerine özgü yedi transmembran alfa sarmalına sahip farklı bir protein ailesi olduğunu gösterdi (bkz. Şekil). Son olarak cDNA klonlarının genomik DNA'ya hibridizasyonu koku reseptörlerinin yüzlerce gen içeren büyük bir çoklu gen ailesi tarafından kodlandığını gösterdi.

Etki

Buck ve Axel tarafından tanımlanan koku reseptörleri en büyük G protein-eşlikli reseptör ailesidir. Genom dizileme, farelerin ve köpeklerin 1000'i aşkın koku reseptör genine sahip olduğunu göstermiştir. İlginç şekilde, koku reseptör geni ailesi insanlarda daha



Koku reseptörü protein ailesi Bir koku reseptör cDNA'sı klonlarının kodladığı protein gösterilmiştir. Protein plazma zarını yedi transmembran α sarmalı ile geçer. Diğer koku reseptörü klonlarında korunmuş olan amino asitler beyaz ile, daha değişken olan amino asitler siyah ile gösterilmiştir.

(sonraki sayfada devam edilmiştir)

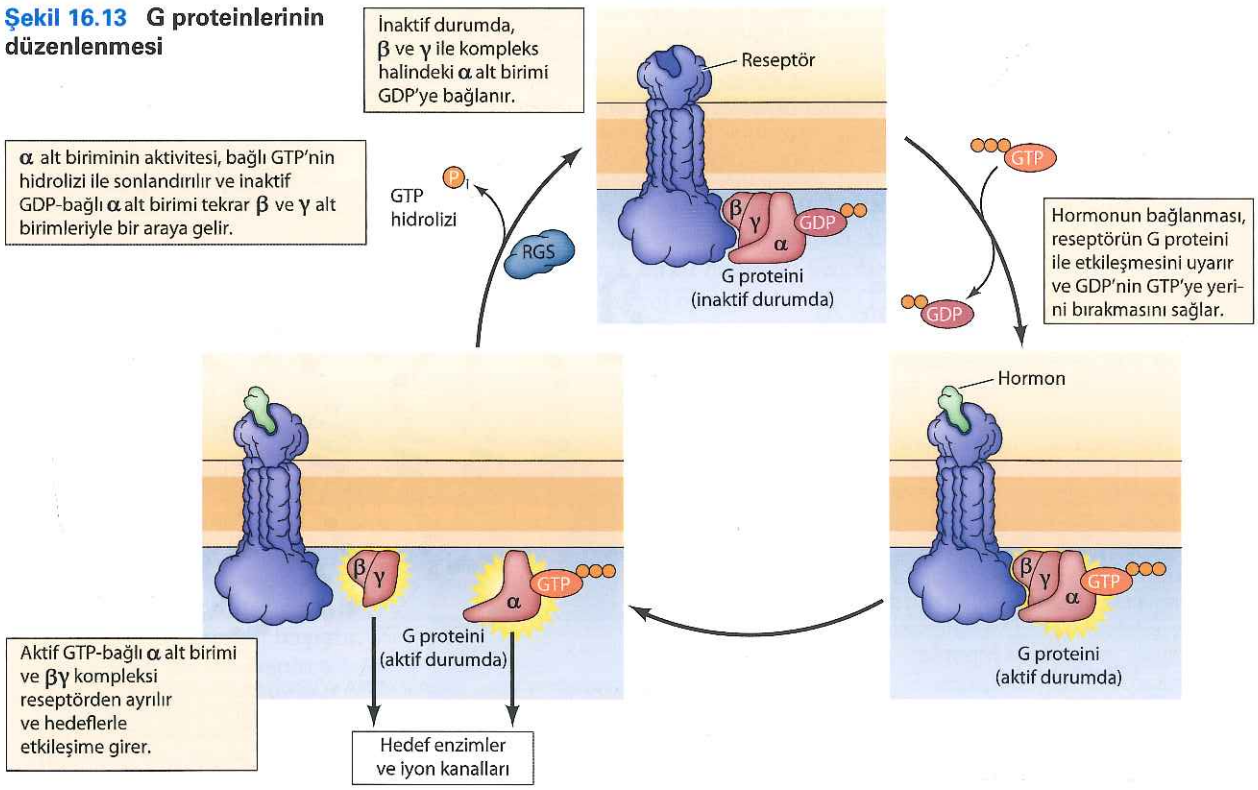
Anahtar Deney

küçük olup 400'den az fonksiyonel gen içerir. Bu durum insanlarda köpeklere ve kemirgenlere oranla daha az gelişmiş koku hissinin olmasıyla tutarlıdır.

Koku reseptörlerinin tanımlanması koku hissinin nasıl çalıştığını anlamak için önemli bir ilk adım teşkil eder. Bireysel olfaktör nöronlar yalnızca bir koku reseptörü eksprese eder. Her bir reseptör birkaç farklı koku yayıcı moleküle bağlanır ve böylece her koku yayıcı, beyne bilgiyi aktarır. Bununla birlikte, hala olfaktör nöronlardan beyne bilgi taşıyan ve beynin bu sinir impulslarını entegre etmesini ve özel kokuları değerlendirmesini sağlayan sinir hücresi ağlarını anlamak durumundayız. Böyle nöral bağlantı ağlarının şifresinin çözülmesi, sinir sisteminde bilginin işlenmesini anlamaya yönelik bir temel araştırma alanı oluşturmaya devam etmektedir.

G proteinleri; α, β ve γ olarak tanımlanan üç alt birim içerirler (**Şekil 16.13**). Ras (Bkz. Şekil 9.40) gibi diğer guanin nükleotid-bağlayan proteinlerden ve nükleer içeri aktarımda (Ran, Bkz. Şekil 10.10), veziküller taşımada (Arf ve Rab, Bkz. Şekiller 11.36 ve 11.37) ve hücre hareketinde (Rho, Bkz. Şekil 13.21) rol alan Ras-benzeri GTP bağlayan proteinlerden ayırt edilebilmeleri için sıklıkla **heterotrimerik G proteinleri** olarak adlandırılır. Heterotrimerik G proteinlerinin α alt birimi G proteininin aktivitesini düzenleyen guanin nükleotidlere bağlanır. Dinlenme halinde α alt birimi, (β ve γ ile kompleks halinde, GDP'ye bağlıdır. Hormon bağlanması reseptörde şekil değişikliğini uyarır, böylece reseptörün sitozoldeki bölümü G proteini ile etkileşime girer. Aktifleştirilmiş G proteini daha sonra bir guanin nükleotid değiştirme faktörü olarak davranarak bağlı GDP'nin salınımını ve GTP ile yer değiştirmesini uyarır. Aktive edilmiş GTP-bağlı α alt birimi bir arada kalan ve $\beta\gamma$ kompleksi olarak fonksiyon görecek olan β ve γ'dan ayrılır. Hem aktif GTP-bağlı a alt birimi hem de $\beta\gamma$ kompleksi bir hücre içi yanıt

Şekil 16.13 G proteinlerinin düzenlenmesi



oluşturmak üzere hedefleri ile etkileşir. *a* alt biriminin aktivitesi bağlı GTP'nin hidrolizi ile sonlandırılır. Bu hidroliz, heterotrimerik G proteinleri için GTPaz aktifleştirici proteinler (GAP'lar) olarak rol oynayan RGS (G proteini sinyal iletimi düzenleyicisi) proteinleri tarafından uyarılır. İnaktif *a* alt birimi (şimdi GDP ile bağlı) $\beta\gamma$ kompleksi ile yeniden etkileşir ve yeniden döngüye başlamak için hazır hale gelir.

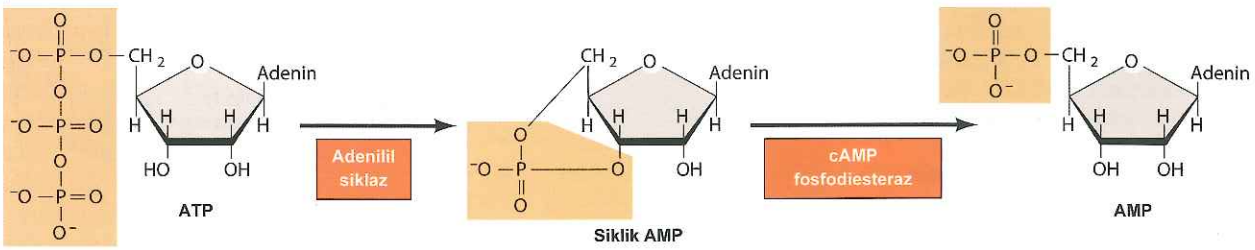
Memeli genomu en az 21 farklı α alt birimini, 6 β alt birimini ve 12γ alt birimini kodlar. Farklı G proteinleri farklı reseptörlerle etkileşir, böylece bu G proteinleri grubu farklı hücre içi hedefleri olan reseptörler ile eşleşir. Örneğin epinefrin reseptörü ile birleşen G proteini α alt birimi, adenilil siklazı stimüle ettiği için G_s olarak adlandırılır (Bkz. Şekil 16.12). Diğer G protein *a* ve $\beta\gamma$ alt birimleri ise adenilil siklazı inhibe edici ya da diğer hedef enzimlerin aktivitelerini düzenleyici etki gösterirler.

Hedef enzimlerin düzenlenmesine ek olarak, bazı G proteinlerinin hem α hem de $\beta\gamma$ alt birimleri doğrudan iyon kanallarını düzenler. Bu konuda iyi bir örnek bir nörotransmiter olan asetilkolinin kalp kası üzerindeki etkisidir. Bu etki sinir ve iskelet kası üzerindeki etkisinden tamamen farklıdır. Sinir ve iskelet kası hücrelerindeki nikotinik asetilkolin reseptörleri ligand kapılı iyon kanallarıdır (Bkz. Şekil 14. 22). Kalp kası hücrelerinin G proteinleri ile birlikte çalışan farklı bir asetilkolin reseptörü vardır. Bu G proteini α alt birimi adenil siklazı inhibe ettiği için, G_i olarak tanımlanır. Buna ek olarak, G_i $\beta\gamma$ alt birimleri doğrudan plazma zarındaki K^+ kanallarını açar, bunun da kalp kası kontraksiyonunu yavaşlatıcı etkisi vardır.

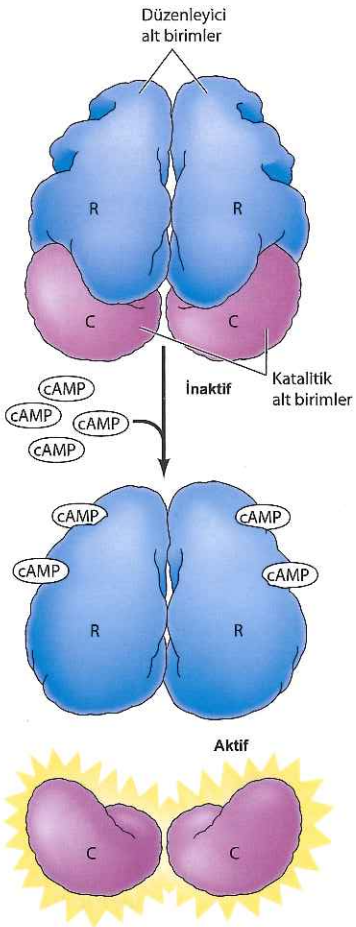
cAMP yolağı: İkinci mesajcılar ve protein fosforilasyonu

Memeli hücrelerindeki sinyal iletiminde G proteininin ana hedefi olan cAMP'nin rolü, 1958'de Earl Sutherland Jr.'ın kas hücrelerinde glikojenin glukoza yıkımını uyaran epinefrin hormone üzerindeki çalışmaları ile keşfedilmiştir. Sutherland epinefrinin etkisinin hücre-içi cAMP konsantrasyonundaki artış ile düzenlendiğini keşfetti, bu keşif cAMP 'nin hormonal sinyal iletiminde (hormonun kendisi birinci mesajcıdır) bir ikinci mesajcı kavramının oluşumuna öncülük etti. cAMP adenilil siklaz etkisi ile ATP den oluşur (G_s tarafından uyarılır) ve **cAMP fosfodiesteraz** tarafından AMP'ye parçalanır (**Şekil 16.14**).

cAMP'nin hayvan hücrelerindeki çoğu etkisi 1968'de Donal Walsh ve Ed Krebs tarafından keşfedilen bir enzim olan, **cAMP-bağımlı protein kinaz,** ya da **protein kinaz A** etkisi ile düzenlenir. Protein kinaz A'nın inaktif formu iki



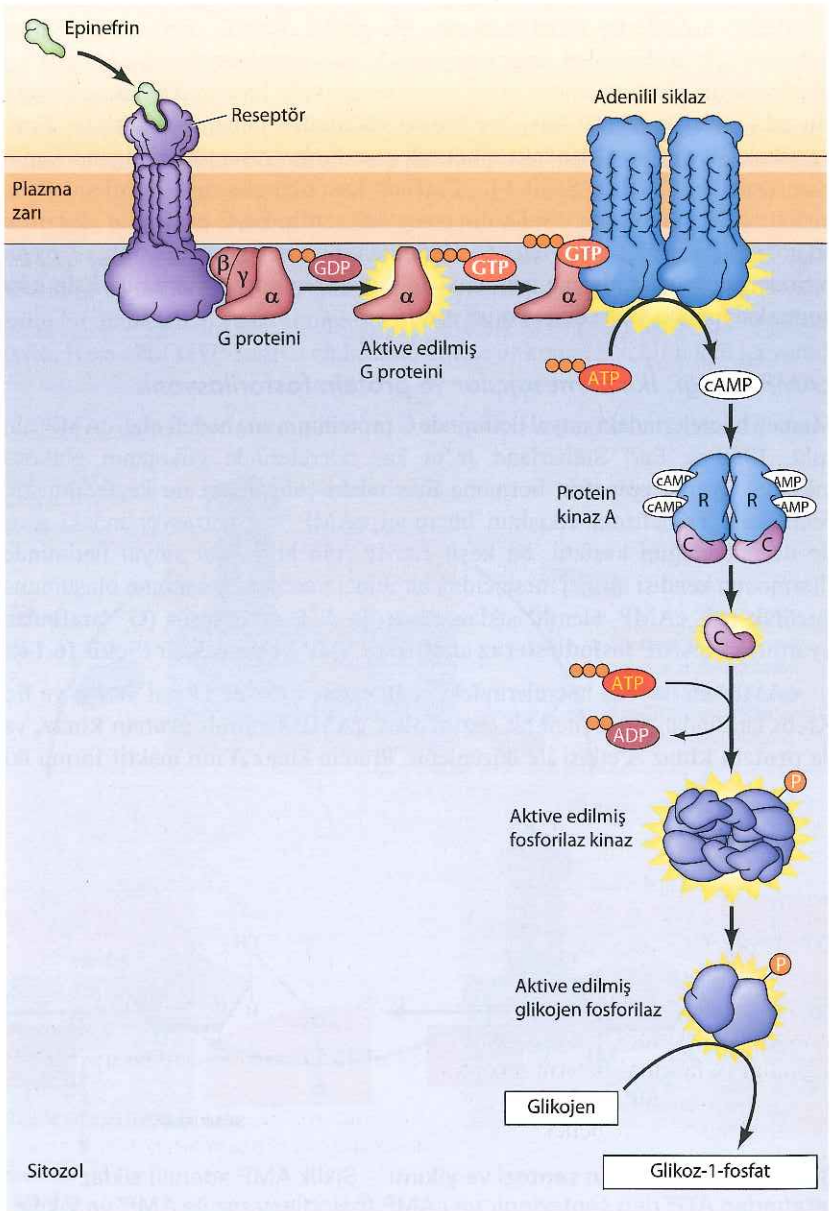
Şekil 16.14 cAMP'nin sentezi ve yıkımı Siklik AMP adenilil siklaz tarafından ATP'den sentezlenir ve cAMP fosfodiesteraz ile AMP'ye yıkılır.



Şekil 16.15 Protein kinaz A'nın düzenlenmesi Protein kinaz A' nın inaktif formu iki düzenleyici (R) ve iki katalitik (C) alt birim içerir. cAMP' nin düzenleyici alt birime bağlanması katalitik birimin ayrılmasına ve enzimatik olarak aktif hale geçmesine neden olan bir konformasyon değişikliğini uyarır.

katalitik ve iki düzenleyici alt birimden oluşan bir tetramerdir (Şekil 16.15). Siklik AMP'nin düzenleyici alt birime bağlanması bu birimlerin katalitik alt birimlerden ayrılmasına yol açar. Böylece, serbest katalitik alt birimler enzimatik olarak aktif olur ve hedef proteinlerini serin kalıntılarından fosforilleyebilir.

Glikojen yıkımının epinefrin tarafından düzenlenmesinde protein kinaz A'nın hedefi yine bir protein kinaz olan ve protein kinaz A tarafından fosforillenen ve aktive edilen fosforilaz kinazdır (Şekil 16.16). Fosforilaz kinaz, daha



Şekil 16.16 Epinefrin ile glikojen metabolizmasının düzenlenmesi Epinefrin ile reseptör uyarılması adenilil siklazın G-proteini tarafından aktivasyonuna yol açar. cAMP protein kinaz A'yı aktive eder, protein kinaz A da fosforilaz kinazı fosforiller ve aktive eder. Fosforilaz kinaz daha sonra glikojen fosforilazı fosforiller ve aktive eder. Glikojen fosforilaz da glikojenin glukoz-1-fosfata yıkılmasını katalizler.

Animasyon 16.3

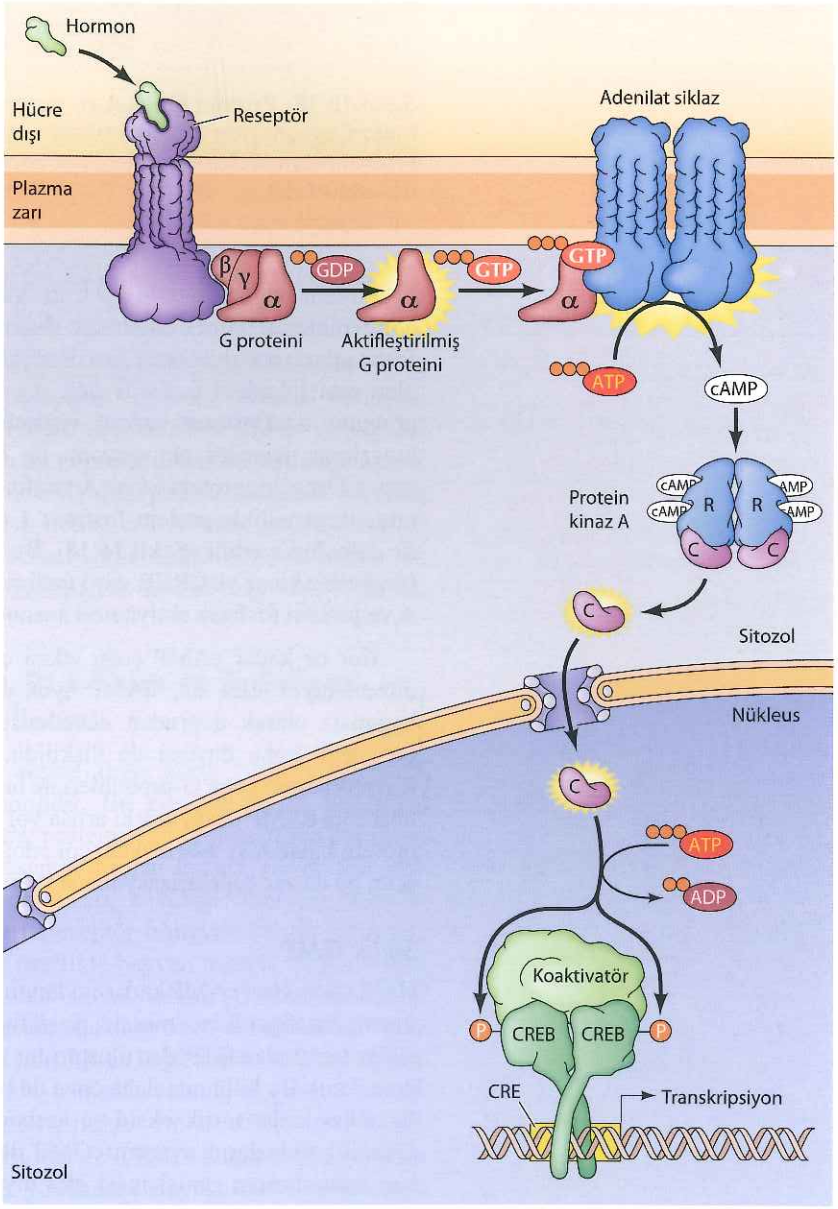
sites.sinauer.com/cooper7e/a16.3

Sinyalin Kuvvetlendirilmesi Bir sinyal iletim yolağında, yolağın bir aşamasında aktifleştirilen her bir enzim bir sonraki enzimin çok sayıda molekülünü aktifleştirerek reseptör-bağlı liganda yanıtı hızlıca kuvvetlendirir.

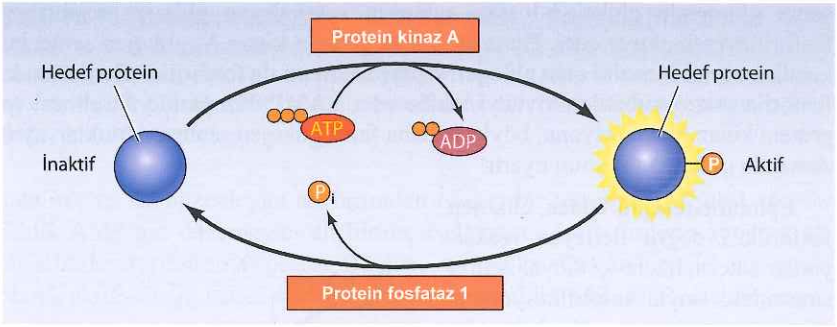
sonra glikojenin glukoz-1-fosfata yıkımını katalizleyen glikojen fosforilazı fosforilleyerek aktive eder. Buna ek olarak protein kinaz A, glikojen sentezini katalize eden bir enzim olan glikojen sentaz enzimini de fosforiller. Bu durumda fosforilasyon enzimatik aktiviteyi inhibe eder. cAMP düzeyinin yükselmesi ve protein kinaz A aktivasyonu, böylece, daha fazla glikojen sentezini bloklar, aynı zamanda glikojen yıkımını uyarır.

Epinefrin reseptöründen, glikojen fosforilaza doğru ilerleyen reaksiyonlar zinciri, hücre-içi sinyal iletimi sırasındaki sinyal amplifikasyonuna iyi bir örnek oluşturur. Her bir molekül epinefrin yalnızca bir tek reseptörü aktive eder. Ancak, her reseptör yüz moleküle kadar G_s aktive edebilir. Bu durumda her molekül G_s, birçok cAMP molekülü sentezini katalize edebilecek olan bir adenil siklazın enzimatik aktivitesini uyarır. Sinyal amplifikasyonu her bir protein kinaz A molekülünün birçok fosforilaz kinaz molekülünü fosforillemesi ile devam eder. Her bir fosforilaz kinaz da, birçok glikojen fosforilaz molekülünü fosforiller. Bu şekilde, hormonların çok az sayıda reseptöre bağlanması çok daha fazla sayıda hücre içi hedef enzimin aktivasyonuna yol açar.

cAMP artışı çoğu hayvan hücresinde **cAMP yanıt elemanı** ya da **CRE** olarak adlandırılan bir düzenleyici diziyi içeren, özgün hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Bu durumda sinyal, protein kinaz A'nın düzenleyici biriminin ayrılması sonrasında nükleusa girebilen katalitik alt birimi tarafından, sitoplazmadan nükleusa taşınır. Nükleus içinde, protein kinaz A, **CREB** (CRE-bağlanan protein) olarak adlandırılan bir transkripsiyon faktörünü fosforilleyerek koaktivatörlerin ve cAMP ile uyarılan genlerin transkripsiyonuna neden olur (Şekil 16.17). cAMP tarafından gen ekspresyonunun bu şekilde düzenlenmesinin, çok çeşitli hayvan hücrelerinin proliferasyon, sağkalım ve farklılaşmalarının kontrolünde önemli roller oynamasının yanı sıra, öğrenme ve bellekte de rol aldığı düşünülmektedir.



Şekil 16.17 Siklik AMP ile uyarılabilen gen ekspresyonu Reseptör uyarılması G proteini tarafından aktive edilen adenilil siklaz aktivasyonuna, cAMP sentezine ve protein kinaz A'nın aktivasyonuna neden olur. Protein kinaz A'nın serbest katalitik alt birimi çekirdeğe geçer ve transkripsiyon faktörü CREB'i (CRE-bağlanan protein) fosforiller, bu da cAMP tarafından uyarılan genlerin ve kofaktörlerin ekspresyonunu sağlar.



Şekil 16.18 Protein kinaz A ve protein fosfataz 1 ile protein fosforilasyonunun düzenlenmesi Hedef proteinlerin protein kinaz A tarafından fosforillenmesi, protein fosfataz 1'in etkisi ile geri dönüştürülür.

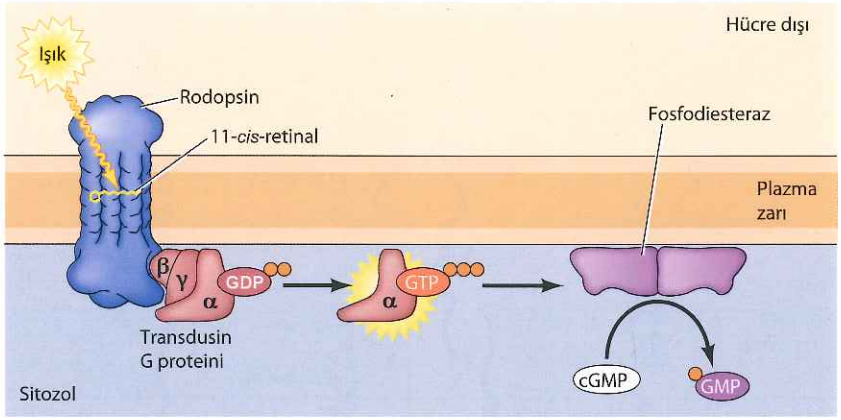
Protein kinaz A gibi protein kinazların hücre içinde bağımsız işlev görmediklerini bilmek önemlidir. Bunun aksine, protein fosforilasyonu, protein fosfatazların etkisiyle hızla geri dönüştürülebilir. Protein fosfatazlar, substratları olan proteinlerdeki fosforile tirozin ya da serin/treonin kalıntılarından fosfat grubunu uzaklaştıran sitozol enzimleridir. Bu protein fosfatazlar protein kinazların, reseptör aktivasyonu ile başlatılan etkilerini sonlandırıcı görev yapar. Örneğin, protein kinaz A tarafından serin kalıntısından fosforillenen bir protein, genellikle protein fosfataz 1 olarak adlandırılan bir fosfatazın etkisi ile defosforile edilir (Şekil 16.18). Bu nedenle, protein kinaz A substratlarının (fosforilaz kinaz ve CREB gibi) fosforilasyon düzeyleri, hücre içi protein kinaz A ve protein fosfataz aktiviteleri arasındaki denge ile belirlenir.

Her ne kadar cAMP çoğu etkisi çoğunlukla protein kinaz A aracılığıyla düzenleniyor olsa da, cAMP iyon kanallarını protein fosforilasyonundan bağımsız olarak doğrudan denetleyebilir. İkinci mesajcı olarak cAMP'nin bu işlevi, koku duyusu ile ilişkilidir. Burundaki duyusal sinirlerdeki koku reseptörlerinin çoğu G-proteinleri ile birlikte çalışan ve adenilil siklazı uyararak hücre-içi cAMP düzeyindeki artışa yol açan reseptörlerdir. Bu sistemde cAMP, protein kinaz A'yı uyarmaktan çok, doğrudan plazma zarındaki Na^+ kanallarını açar, bu da zar depolarizasyonuna ve sinir uyarımının başlatılmasına yol açar.

Siklik GMP

Henüz görevleri cAMP kadar iyi tanımlanmış olmasa da, hayvan hücreleri için önemli bir diğer ikinci mesajcı da siklik GMP (cGMP) dir. Siklik GMP guanilil siklaz tarafından GTP'den oluşturulur ve bir fosfodiesteraz tarafından GMP'ye parçalanır. Bu bölümde daha önce de tartışıldığı gibi, guanilil siklazlar, peptid ligandlar kadar nitrik oksid ve karbon monoksit tarafından da aktive edilir. Guanilil siklazların uyarımı cGMP düzeyinin yükselmesine yol açar, bu da kan damarlarının genişlemesi gibi biyolojik yanıtları düzenler. Her ne kadar cGMP iyon kanallarını ve başka hedefleri de düzenleyici rol oynayabiliyorsa da, etkisi sıklıkla cGMP-bağımlı protein kinaz aktivasyonu ile düzenlenir.

cGMP'nin iyi tanımlanmış bir rolü omurgalıların gözündedir, burada cGMP, ışık gibi, alınan görsel sinyallerin sinir uyarılarına çeviriminden sorumlu bir ikinci mesajcı olarak görev yapar. Retina çubuk hücrelerindeki



Şekil 16.19 Işığın algılanmasında Siklik cGMP'nin rolü Işığın 11-*cis*-retinal tarafından emilmesi G proteini-eşlikli bir reseptör olan rodopsini aktive eder. Bu durumda transdüsinin α alt birimi $\beta\gamma$ alt birimden ayrılır ve cGMP fosfodiesterazı uyarır, bu da hücre içi cGMP düzeyinin azalmasını sağlar.

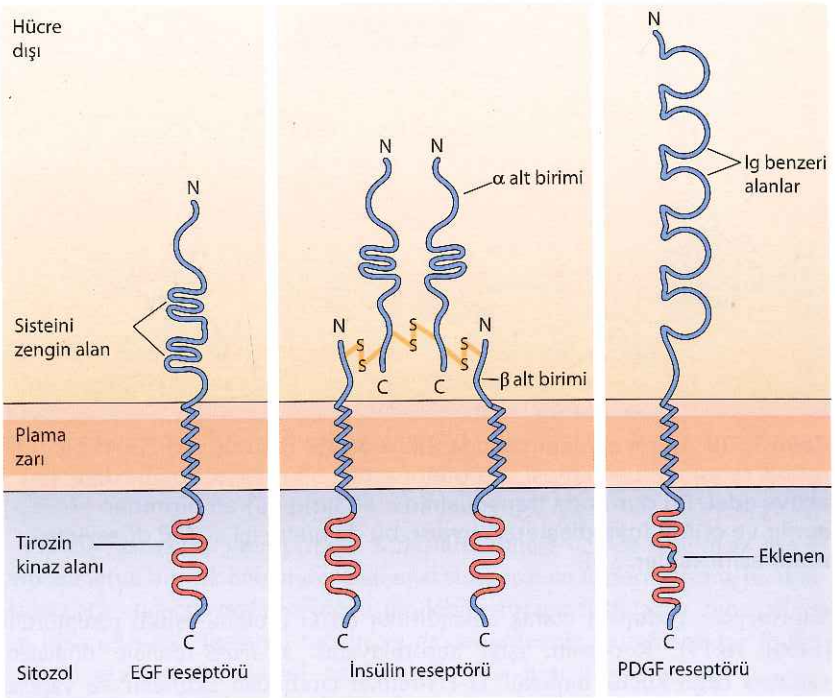
fotoreseptör, **rodopsin** olarak adlandırılan bir G proteini-eşlikli reseptördür (Şekil 16.19). Rodopsin, ışığı absorblayarak all-*trans*-retinale dönüşen, yapısına bağlı küçük molekül 11-*cis*-retinal tarafından aktiflenir ve yapısal değişikliğe uğrar. Bu durumda rodopsin bir G proteini olan **transdüsini** aktive eder, transdüsinin α alt birimi hücre-içi cGMP düzeyinin azalmasına yol açan **cGMP fosfodiesteraz** aktivitesini uyarır. Retina çubuk hücrelerindeki cGMP düzeyindeki bu değişim, cAMP'nin kokuları algılamadaki etkisine benzer bir şekilde, cGMP'nin plazma zarındaki iyon kanalları üzerine doğrudan etkisi ile, bir sinir uyarısına dönüştürülür.

Tirozin Kinazlar ve MAP Kinaz, PI 3-Kinaz ve Fosfolipaz C/Kalsiyum Yolakları ile Sinyal İletimi

G proteini-eşlikli çalışan reseptörlerin aksine, diğer hücre yüzey reseptörleri doğrudan hücre içi enzimlerle bağlantılıdır. Bu gibi enzim ile bağlantılı reseptörler arasında en geniş aile, substrat proteinlerini tirozin amino asitinden fosforilleyen **tirozin kinazları'dır** (reseptör tirozin kinaz). Diğer pek çok reseptör kendileri tirozin kinaz değildir ancak kovalent olmayan bağlarla bağlandıkları hücre içi tirozin kinazları (reseptör olmayan tirozin kinazlar) uyararak görev yapar. Tirozin kinazlar özellikle hayvan hücresi büyümesinin ve farklılaşmasının kontrolünde rol alan sinyal iletim yolaklarının temel elemanları olarak iyi çalışılmıştır. Gerçekten de ilk protein-tirozin kinaz, Rous sarkoma virüsünün onkogenik proteini çalışılırken keşfedilmiştir (Bkz. Bölüm 9 Anahtar Deney) ve bu çalışma tirozin fosforilasyonunu doğrudan kanser hücrelerinin anormal büyümesi ile ilişkilendirmiştir. Bölüm 19'da tartışılacağı üzere, günümüzde yeni kanser tedavileri için geliştirilen ilaçların çoğu tirozin kinaz inhibitörleri ya da onların aşağı yönündeki sinyal iletim yolaklarının inhibitörleridir.

Reseptör tirozin kinazlar

Reseptör tirozin kinazlar birçok polipeptid büyüme faktörünün reseptörlerini içermektedir ve bu tirozin fosforilasyonunun hücrelerin büyüme faktörü

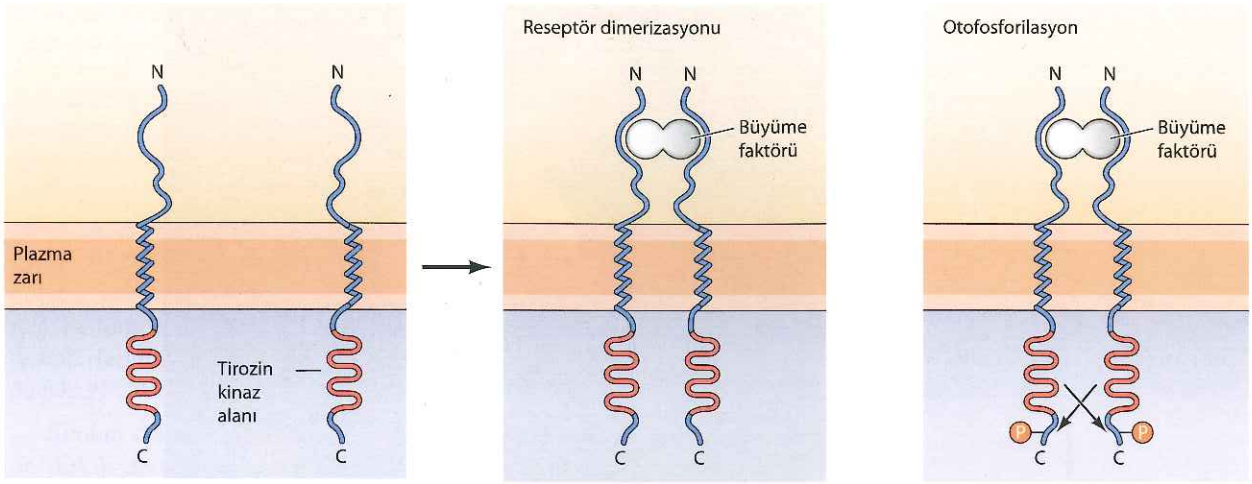


Şekil 16.20 Reseptör tirozin kinazların organizasyonu Her reseptör, bir N-ucu ekstraselüler bağlanma bölgesi, mebranı geçen bir α heliks ve sitozolde protein-tirozin kinaz aktivitesi olan bir C-ucu bölgesi içerir. Şekilde üç farklı alt aileden reseptör protein-tirozin kinazların yapısı görülmektedir. EGF reseptörü ve insülin reseptörlerlerinin her ikisinin de sisteinden zengin ekstraselüler bölgeleri vardır, buna karşın PDGF reseptörünün ekstraselüler bölgesinde Ig benzeri bölgeler vardır. PDGF reseptörünün kinaz bölgesi, çoğu diğer protein-tirozin kinazların katalitik bölgelerinde bulunanlardan farklı, yaklaşık yüz amino asitlik bir ara parça eklentisine sahiptir. İnsülin reseptörü iki çift polipeptid zincirinden (α ve β olarak tanımlanan) bir dimer oluşturması ile diğer reseptörlerden farklıdır.

Video 16.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v16.1
Reseptör Tirozin Kinazlar
Reseptör tirozin kinazlar çok sayıda polipeptid büyüme faktörüne, sitokinlere ve hormonlara bağlanarak sinyal iletimini başlatır.

uyarısına yanıt vermede kilit bir sinyal iletim mekanizması olduğunu kanıtlamaktadır. İnsan genomu EGF, NGF, PDGF, insülin ve birçok diğer büyüme faktörlerinin reseptörlerini de içeren 58 reseptör protein-tirozin kinazı kodlar. Bu reseptörlerin hepsi ortak bir yapısal organizasyonu paylaşır: Bir N-ucu ekstraselüler ligand-bağlama bölgesi, bir tekli transmembran α heliks, ve protein-tirozin kinaz aktivitesi olan sitozoldeki bir C-ucu bölgesi (Şekil 16.20). Çoğu reseptör protein-tirozin kinaz tek bir polipeptid zinciri içerdiği halde, insülin reseptörü ve ilgili bazı reseptörler iki polipeptid zincirinden oluşan dimerlerdir. Bu reseptörlerin hücre dışındaki bölümleri ile ligandlarına (örn., büyüme faktörleri) bağlanmaları sitozoldeki kinaz bölgesini aktive eder. Bu aktivasyon hem reseptörün kendisinin hem de büyüme faktörü bağlanmasıyla başlatılan sinyalleri ileten hücre içi hedef proteinlerin fosforillenmesine neden olur.

Çoğu reseptör protein-tirozin kinaz sinyal iletiminde, ilk basamak ligand tarafından uyarılan reseptör dimerizasyonudur (Şekil 16.21). PDGF ve NGF gibi bazı büyüme faktörleri, kendileri, identik iki-polipeptid zincirinden oluşan dimerlerdir; bu büyüme faktörleri iki farklı reseptör molekülüne eş zamanlı

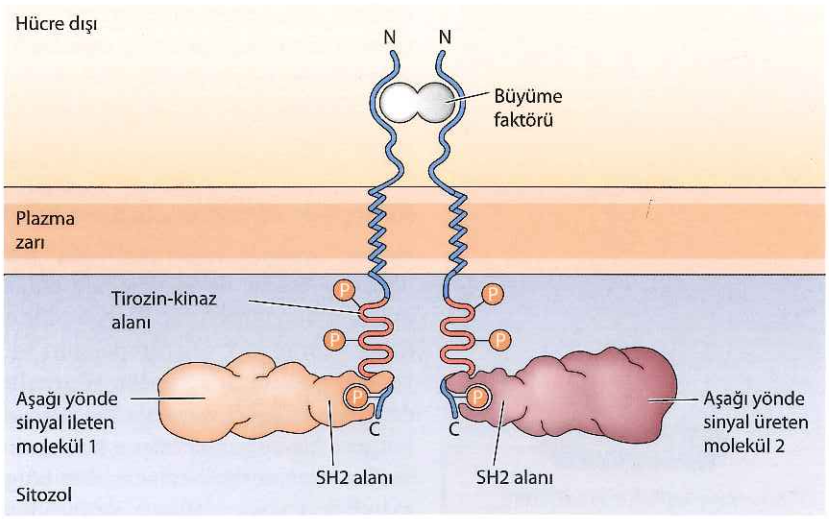


Şekil 16.21 Reseptör protein-tirozin kinazların dimerizasyonu ve otofosforilasyonu Büyüme faktörünün bağlanması reseptör dimerizasyonunu uyarır ve bu da iki polipeptid zincirinin karşılıklı olarak birbirlerini fosforillemesi olarak tanımlanabilen reseptör otofosforilasyonu ile sonuçlanır.

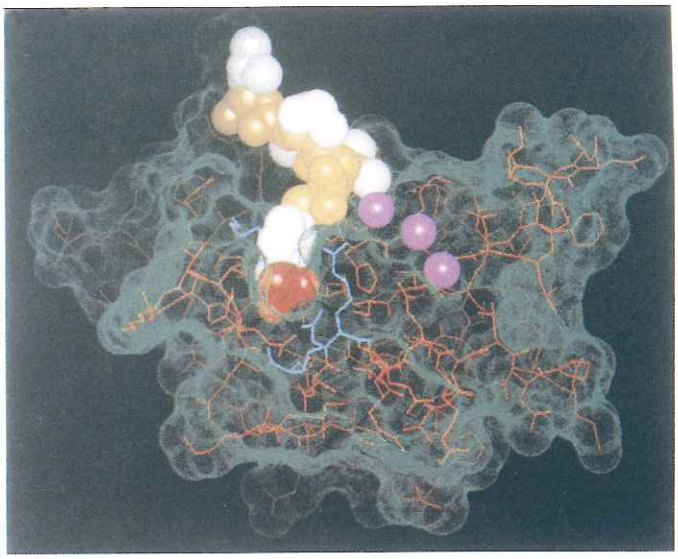
olarak bağlanarak doğrudan dimerizasyonu uyarır. Diğer büyüme faktörleri (EGF gibi) monomerik moleküllerdir, ancak farklı reseptör polipeptidleri arasında protein-protein etkileşimlerini sağlayan konformasyonel değişikliklerin uyarılması sonucunda reseptör dimerizasyonuna yol açar.

Ligand-tarafından uyarılan dimerizasyon daha sonra, dimerize polipeptid zincirlerinin birbirlerini karşılıklı fosforillemesi ile reseptörün **otofosforilasyonuna** neden olur (Bkz. Şekil 16.21). Bu otofosforilasyon, bu reseptörlerden sinyal iletiminde iki kilit rol oynar. İlk olarak, katalitik bölgedeki tirozinlerin fosforillenmesi protein kinaz aktivitesini artırır. İkincisi, katalitik bölge dışındaki tirozin kalıntılarının fosforilasyonu hücre içi sinyalleri, aktif reseptörden, aşağı yöndeki moleküllere iletecek ek proteinler için özgün bağlanma bölgeleri yaratır.

Reseptör protein-tirozin kinazlar ile aşağı yöndeki sinyal ileti molekülleri arasındaki bu etkileşim, özgün fosfotirozin-içeren peptidlere bağlanan protein bölgeleri (domeyn) tarafından düzenlenir (Şekil 16.22). Tanımlanan bu bölgelerden birincisi, ilk kez Rous sarkoma virusundaki onkogenik bir protein olan Src ile ilintili bir



Şekil 16.22 Reseptör protein- tirozin kinazlar ile aşağı-yöndeki sinyal iletimi moleküllerinin bağlanmaları SH2 bölgeleri aktive edilmiş reseptörlerin fosfotirozin içeren spesifik peptidlerine bağlanır.



Şekil 16.23 Bir SH2 bölgesi ve bir fosfotirozin peptid arasındaki bağlantı Src SH2 bölgesinin polipeptid zinciri kırmızı ile, yüzeyi ise yeşil noktalarla gösterilmiştir. Mor daireler yüzeydeki oluğa karşılık gelmektedir. Fosfotirozin ile etkileşime giren amino asit kalıntıları ise mavi renkte gösterilmiştir. Fosfotirozin içeren peptid dolgu model ile gösterilmiştir. Sarı ve beyaz daireler sırasıyla iskeleti ve yan zincirdeki atomları temsil etmektedir, fosfat grubu ise kırmızı ile gösterilmiştir (G. Waksman ve 13 diğer kişi, 1992. *Nature* 358:646).

protein-tirozin kinazda tanımlandığı için, **SH2 bölgesi** *(Src homoloji 2)* olarak adlandırılır. SH2 bölgeleri yaklaşık 100 amino asid uzunluğundadır ve fosfotirozin kalıntısı içeren özgün kısa peptid dizilere bağlanır (Şekil 16.23). SH2-içeren proteinler ile aktif protein-tirozin kinazlar arasındaki etkileşimin sonucunda birçok etki ortaya çıkabilir: Bu proteinlerin plazma zarında yerleşiminin sağlanması, diğer proteinler ile etkileşimlerine öncülük etmesi, fosforilasyonlarını başlatması ve enzimatik aktivitelerini uyarması. Bu proteinlerin otofosforile reseptörler ile etkileşimi, böylece, büyüme faktörlerinin hücre yüzeyine bağlanması ile başlatılan sinyallerin hücre içine iletiminde ilk basamağı temsil eder.

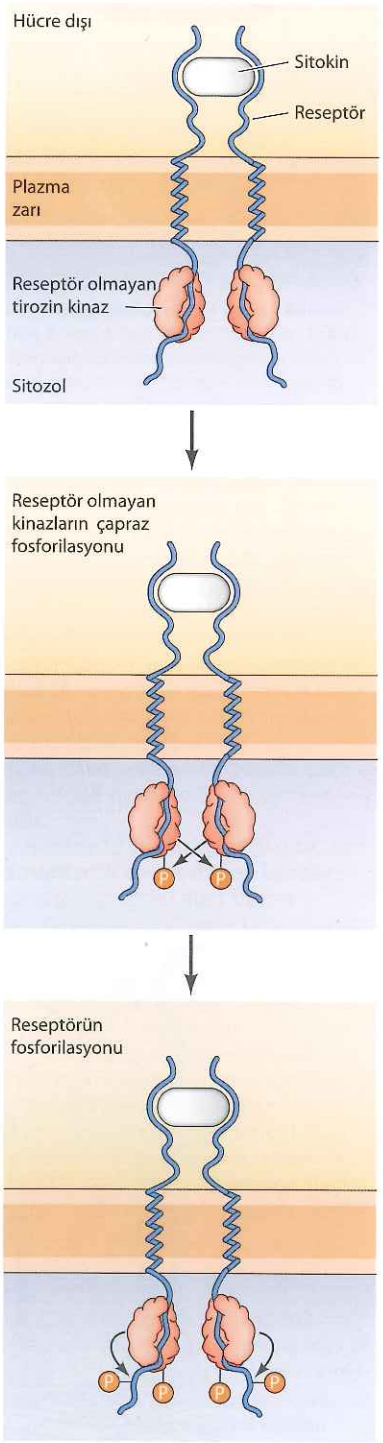
Reseptör olmayan tirozin kinazlar

Birçok reseptör içsel enzimatik aktiviteye sahip olmak yerine, kovalent olmayan bağlar ile etkileşimde oldukları, hücre içi protein-tirozin kinazları uyararak etki gösterirler. Bu **reseptör olmayan tirozin kinazlar,** çoğu sitokinin (örn., interlökin-2 ve eritropoietin) ve bazı polipeptid hormon reseptörlerin de yer aldığı **sitokin reseptör süperailesi** üyelerini içerir. Sitokin reseptörleri de, reseptör protein-tirozin kinazlar gibi, N-ucu ekstraselüler ligand-bağlama bölgesi, bir transmembran α heliks ve C-ucu sitozolik bölgesini içerir. Ancak, sitokin reseptörlerinin sitozolik bölgelerinin bilinen herhangi bir katalitik aktiviteleri yoktur. Bunun yerine, ligand bağlanması sonucunda aktive olan reseptör olmayan protein-tirozin kinazlar ile etkileşime girerek işlev görür.

Sitokin reseptörleri aracılıklı sinyal iletiminde birinci basamağın, ligand-tarafından uyarılan reseptör dimerizasyonu ve ilişkili olduğu reseptör

Bilgi İçin

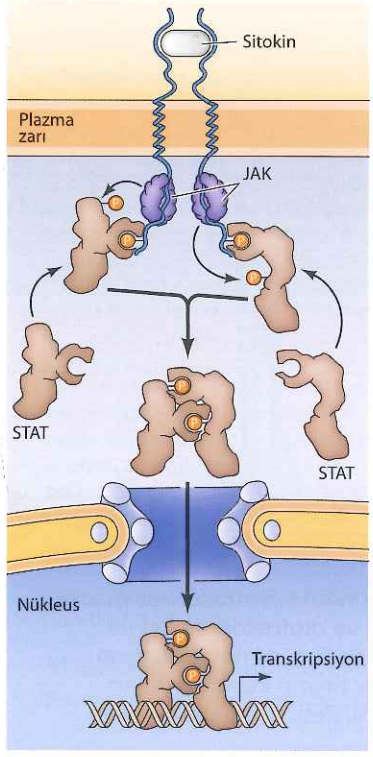
Sitokin reseptörleri insan immün yetmezliği virüsü (HIV) tarafından immün hücrelerini enfekte etmek için hücre yüzeyi reseptörleri olarak kullanılır.



Şekil 16.24 Reseptör olmayan tirozin kinazların aktivasyonu Ligand bağlanması reseptör dimerizasyonunu uyarır ve karşılıklı-fosforillenme sonucunda, bağlantılı bulunduğu reseptör olmayan tirozin kinazların aktivasyonunu sağlar. Böylece aktive olan kinazlar reseptörü tirozin kalıntılarından fosforilleyerek, aşağı yöndeki sinyal iletimi molekülleri için fosfotirozin bağlanma bölgeleri yaratır.

olmayan tirozin kinazların çapraz-fosforillenmesi olduğu düşünülmektedir (Şekil 16.24). Böylece, bu aktif kinazlar reseptörü fosforilleyebilir ve SH2 bölgesi içeren aşağı yöndeki sinyal iletimi moleküllerinin bir araya gelmesi için fosfotirozin-bağlanma bölgeleri oluşumunu sağlar. Bu nedenle sitokin reseptörlerinin ilişkili olduğu reseptör olmayan tirozin kinazlarla birleşimi, bir önceki bölümde anlatılan reseptör tirozin kinazlar ile benzer işleve sahiptir.

Sitokin reseptörleri ile birleşen kinazlar reseptör olmayan tirozin kinazlar ile ilişkili dört üyeyi içeren **Janus kinaz** (ya da **JAK**) ailesi üyesidir. JAK kinazlarının önemli hedefleri, ilk olarak sitokin reseptörü sinyal iletiminde ortaya çıkarılan **STAT proteinleridir** (sinyal iletimcileri ve transkripsiyon aktivatörleri) (Şekil 16.25). STAT proteinleri, SH2 bölgeleri olan yedi transkripsiyon faktörü içeren bir ailedir. Uyarılmamış hücrelerde inaktif olup sitoplazmada yerleşmişlerdir. Sitokin reseptörlerinin uyarılması, SH2 bölgeleri aracılığı ile polipeptid reseptörlerin sitoplazmik bölümlerindeki fosfotirozin içeren dizilere bağlanan STAT proteinlerinin toplanmasına neden olur. STAT proteinleri, aktif reseptörlere bağlanmalarını takiben, JAK ailesi kinazları tarafından fosforillenir. Tirozin fosforilasyonu STAT proteinlerinin dimerizasyonunu uyarır, böylece STAT'lar hedef genlerinin transkripsiyonunu uyaracakları yer olan nükleusa geçer. Daha sonraki çalışmalar STAT proteinlerinin reseptör tirozin kinazların aşağı yönünde de aktif olduklarını gösterdi. Burada STAT'ların fosforilasyonu,



Şekil 16.25 JAK/STAT yolağı STAT proteinleri SH2 bölgesi olan transkripsiyon faktörleridir, bu bölgeler onların fosfotirozin içeren dizilere bağlanmasını sağlar. Uyarılmamış hücrelerde, STAT proteinleri sitozolde inaktif durumdadır. Sitokin reseptörlerinin uyarımı, STAT proteinlerinin reseptöre bağlanmalarına yol açar, burada reseptör ile bağlantılı JAK protein-tirozin kinaz tarafından fosforillenir. Daha sonra fosforile STAT proteinleri dimerize olur ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive edecekleri yer olan nükleusa geçer.

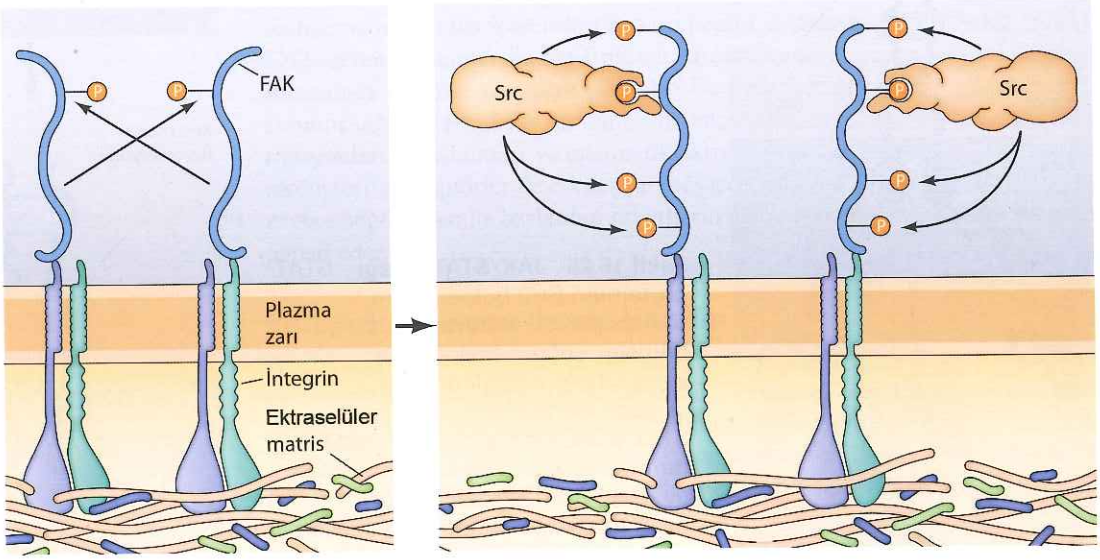
Bilgi İçin

Büyüme hormonu JAK/STAT yolağını aktive etmede işlev görür.

hem reseptörlerin kendileri, hem de bağlı oldukları reseptör olmayan kinazlar tarafından katalizlenebilir. STAT transkripsiyon faktörleri böylece hücre yüzeyindeki sitokin ve büyüme faktörleri ile çekirdekteki gen ekspresyonunun düzenlenmesi arasındaki doğrudan bağlantılar olma görevini görür.

Diğer reseptör olmayan protein-tirozin kinazlar, Src ve sekiz adet yakın ilişkili proteini içeren, **Src** ailesi üyesidir. Daha önce de belirtildiği gibi, Src ilk olarak Rous sarkoma virüsünün onkogenik proteini olarak tanımlanmıştır ve protein-tirozin kinaz aktivitesine sahip olduğu gösterilen ilk proteindir. Bundan dolayı Src hücre sinyal iletiminin anlaşılmasında bugünkü aşamaya gelmemizi sağlayan deneylerin gerçekleştirilmesinde yaşamsal bir rol oynar. Src ailesi üyeleri, sitokin reseptörlerin, reseptör tirozin kinazların, B ve T lenfositleri üzerindeki antijen reseptörlerin ve hücre-hücre ile hücre-matriks etkileşimlerinde yer alan reseptörlerin aşağı yönündeki sinyal iletiminde kilit roller oynar.

İntegrinler, Bölüm 15'te de tartışıldığı gibi, hücrelerin ekstraselüler matrikse tutunmasından sorumlu en önemli reseptörlerdir (Bkz. Şekil 15.22). Bu yapısal role ek olarak, integrinler hücre içi sinyal iletim yolaklarını aktive eden ve dolayısıyla hücre-matriks etkileşimlerine yanıt olarak hücre hareketini ve hücre davranışının diğer unsurlarını (hücre proliferasyonu ile sağ kalımını da içeren) kontrol eden reseptörler olarak da görev alır. Sitokin reseptörleri gibi, integrinlerin de, içsel enzimatik aktivitesi olmayan kısa sitoplazmik kuyrukları vardır. Ancak, integrinlerin ekstraselüler matriks bileşenleri ile etkileşimlerine erken yanıtının tirozin fosforilasyonu olması, integrinlerin reseptör olmayan tirozin kinazlar ile bağlantılı olduğunu akla getirmektedir. İntegrinlerin aşağı yöndeki sinyal iletiminin bir tipi **FAK** (fokal adhezyon kinaz) olarak adlandırılan bir reseptör olmayan tirozin kinazın aktivasyonu ile gerçekleşir (**Şekil 16.26**). Adından da anlaşılabileceği gibi, FAK, fokal adhezyonlarda



Şekil 16.26 İntegrin sinyal iletimi İntegrinlerin ekstraselüler matrikse bağlanması, integrinlerin kümelenmesine ve otofosforilasyon ile FAK aktivasyonuna neden olur. Bu durumda Src, otofosforilasyon bölgesinden FAK'a bağlanır ve FAK'ı diğer tirozin kalıntılarından fosforiller. Bu kalıntılar aşağı yöndeki sinyal iletimi molekülleri için bağlanma bölgeleri oluşturur.

Moleküler Tıp

Kanser: Sinyal İletimi ve *ras* Onkogenleri

Hastalık

Kanser, her dört Amerikan vatandaşından bir tanesinin yaşamını tehdit etmekte ve Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 590,000 ölüme yol açmaktadır. Bilinen 100'den fazla kanser çeşidi vardır, ancak bazı kanserler diğerlerine göre daha sık gözlenir. ABD'de en yaygın olan ölümcül kanser çeşitleri arasında akciğer ve kolon/rektum gelmektedir ki, bu iki kanser çeşidi kanser kökenli ölümlerin yaklaşık %35'ini oluşturmaktadır. Kanser kökenli mortaliteye etki eden diğer temel kanser çeşitleri meme, prostat ve pankreastır ve bunlar, sırasıyla, ABD'de ölümlerin %6.9, %6.9 ve %4.7'sinden sorumludur.

Bütün kanserlerin ortak özelliği, vücut geneline yayılan, normal doku ve organları sararak hastanın ölümüne neden olan kanser hücrelerinin kontrolsüz proliferasyonudur. Bölgesel kanserlerin tedavisinde cerrahi müdahale ve radyoterapi etkili olmakla birlikte, bu tedaviler vücutta uzak bölgelere yayılmış olan kanser hücrelerine ulaşmada etkin olamamaktadır. Bu nedenle bu kanserlerin tedavisinde kemoterapötik ilaçların kullanılması gerekmektedir. Günümüzde kullanılmakta olan kematerapötik ilaçlar maalesef kanser hücrelerine özgün değildir. Çoğu DNA'da hasar oluşturarak ya da DNA sentezini engelleyerek etki göstermektedir. Bu yüzden sindirim sistemini kaplayan epitel hücreleri ve kemik iliğindeki kan yapan hücreler gibi, hızla bölünmekte olan normal hücreleri de öldürmektedir. Bu ilaçların toksisiteleri etkinliklerini kısıtlamakta ve hasta tarafından tolere edilebilen dozları, birçok kanserin elimine edilmesinde yeterli olamamaktadır. Sonuç olarak, kanser tedavisinde büyük ilerlemeler kaydedilmesine rağmen kanser tanısı konmuş olan hastaların yaklaşık yarısı hastalık nedeniyle ölmektedir.

Moleküler ve Hücresel Temel

Rous sarkoma virüsünün src geni gibi normal bir hücreyi kanser hücresine dönüştürebilen viral genlerin tanımlanması, ilk kez kanserin spesifik genlerin (onkogenlerin) etkileri sonucunda oluşabileceğini göstermiştir. Bunun devamında, viral onkogenlerin normal hücrelerin genleri ile benzer olduğunun anlaşılması, virüs tarafından uyarılmamış kanserlerin (ki bu grup birçok insan kanserini kapsamaktadır) normal hücresel genlerdeki mutasyonlar sonucunda oluşabildiğini göstermiştir. Bir başka deyişle, bu tip kanserlerde viral köken yerine hücresel kökenli onkogenler önemli olmaktadır. Bu gibi hücresel onkogenler insan kanserlerinde ilk olarak 1981 yılında tanımlanmıştır. Bundan kısa bir süre sonra, mesane, akciğer ve kolon kanserlerindeki insan onkogeninin, daha önce sıçan sarkom virüslerinde tanımlanmış olan, *ras* genlerine benzer oldukları bulunmuştur.

Günümüzde birçok farklı genin kanser gelişiminde kritik rol oynadığının bilinmesine rağmen, *ras* genindeki mutasyonlar insan tümörlerinde en yaygın görülen genetik bozukluktur. Mutant *ras* onkogenleri, akciğer kanserlerinin %25'inde, kolon kanserlerinin %50'sinde ve pankreatik kanserlerin %90'dan fazlasında ve bütün insan kanserlerinin yaklaşık %25'inde gözlenmektedir. Üstelik, *ras* onkogenlerinin etkileri, hücre proliferasyonunu düzenleyen sinyal ileti yollarındaki bozukluklar ile insan kanser gelişimi arasında bir ilişkili olduğunu açıklığa kavuşturmuştur. Normal *ras* genini onkogene dönüştüren mutasyonlar Ras proteinleri tarafından gerçekleştirilen GTP hidrolizini azaltmaktadır. Bunun sonucunda mutant onkojenik Ras proteinleri, ekstraselüler sinyallere yanıt olarak inaktif ve aktif formlar arasında geçiş göstermek yerine, aktif GTP-bağlı formda kalmaktadır. Bu nedenle Ras'ı aktive etmek ve normal hücrelerin proliferasyonu ile ilgili sinyalleri iletmek için gerekli olan büyüme faktörlerinin yokluğunda bile onkojenik Ras proteinleri ERK sinyal yolunu sürekli olarak uyararak hücre proliferasyonunu tetikleyebilmektedir.

İnsan kolon polip örneği (kolon kanserinde erken evre), *ras* onkogenleri bütün kolon kanserlerinin, yaklaşık yarısının gelişimine etki etmektedir (E.P. Ewing, Jr., Centers for Disease Control).

Önlem ve Tedavi

İnsan kanserlerinde mutasyona uğramış onkogenlerin varlığının gösterilmesi ile onkogen proteinlerini hedefleyen spesifik ilaçların geliştirilmesi olasılığı ortaya çıkmıştır. Kural olarak, bu gibi ilaçlar, geleneksel kemoterapötik ilaçların aksine kanser hücreleri üzerinde selektif etki gösterebilir. İnsan kanserlerinde *ras* geni sıklıkla mutant formda bulunduğundan, bu gen ürünü olan proteinler potansiyel ilaç hedefi olarak dikkat çekmektedir.

Bölüm 19'da tartışıldığı gibi, son zamanlarda seçici olarak kanser hücrelerini hedef alan ilaçlar Ras'ın yukarı yönünde tirozinkinaz onkogenlerine karşı geliştirilmektedir. Birçok çeşit başka ilaç da Ras'ın aşağı yönünde yer alan Raf gibi protein kinazları hedeflemektedir. Dolayısıyla insan tümörlerinde onkogenlerin tanımlanması, insan kanserlerinde kanser gelişiminden sorumlu sinyal iletim yolaklarını hedefleyerek etkin ve spesifik şekilde etki gösteren ilaçların geliştirilmesi için yeni stratejilerin önünü açmıştır.

Kaynaklar:

Der, C. J., T. G. Kromiris and G. M. Cooper. 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 79: 3637-3640.

Parada, L. F., C. J. Tabin, C. Shih and R. A. Weinberg. 1982. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene. *Nature* 297:474-478.

yerleşir ve integrinlerin fibronektin gibi ekstraselüler matriks bileşenlerine bağlanmasını takiben, tirozinden hızla fosforillenir. Diğer protein kinazlar gibi, FAK aktivasyonu ekstraselüler matrikse bağlanan integrinlerin gruplaşması sonucunda otofosforilasyonun uyarılmasını içerir. FAK otofosforilasyonu, Src ailesi üyelerinin yanı sıra diğer aşağı yöndeki sinyal moleküllerini de içeren, SH2 bölgeleri bulunan sinyal iletimi molekülleri için tutunma bölgeleri yaratır.

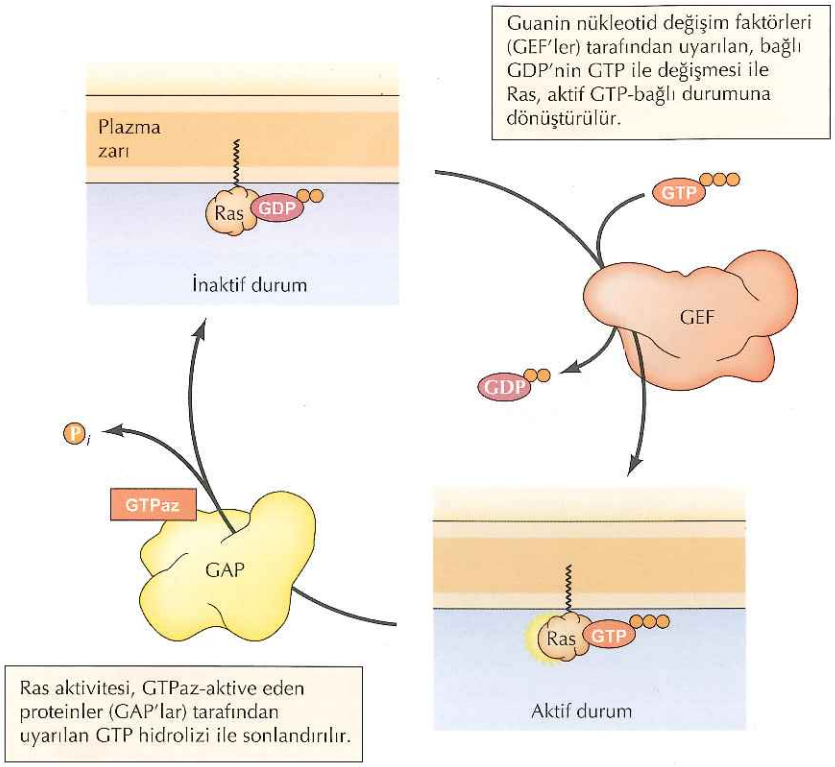
Hücreler arasındaki ve hücreler ile ekstraselüler matriks arasındaki etkileşimler, çok hücreli organizmalarda önemli roller oynar. Örneğin bu etkileşimler, epitel hücre tabakalarının oluşumunda olduğu gibi, hücrelerin dokulara organize olmasını kontrole eder. Bölüm 15'te tartışıldığı üzere, hücre-hücre etkileşimleri, dört ana hücre adhezyon molekülü ailesi tarafından yönetilir; bunlar integrinler, selektinler, Ig süperailesi üyeleri ve kadherinlerdir (Bkz. Tablo 15.2). İntegrinler gibi (yukarıda tartışıldı), Ig süperailesi ve kadherinler de, hücre davranışlarının çeşitli yönlerini kontrol eden sinyal iletim yolaklarına bağlıdır. Bu, en azından kısmen, Src ailesi üyeleri de dahil olmak üzere reseptör olmayan tirozin kinazların uyarılması ile gerçekleşir.

MAP kinaz yolakları

MAP kinaz sinyal iletimi, başlıca sinyal iletim yolaklarının biri olup hem reseptör hem de reseptör olmayan tirozin kinazların aşağı yönünde aktive edilir. MAP kinaz yolağı denilince, evrimsel olarak korunmuş ve mayadan insana kadar tüm ökaryot hücrelerde sinyal iletiminde merkezi rol oynayan, bir dizi protein kinaz anlaşılır. Bu yolağın merkezi elemanları, çok sayıda büyüme faktörü ve diğer sinyal iletimi molekülü uyarımına yanıt olarak aktive olan **MAP kinazlar** (mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz) denilen bir protein-serin/treonin kinaz ailesidir. Mayalarda, MAP kinaz yolağı eşleşmeyi, hücre şeklini ve sporlanmayı da içeren, çok sayıda hücresel yanıtı kontrol eder. Yüksek ökaryotlarda (*C.elegans*, *Drosophila,* kurbağalar ve memeliler) MAP kinazlar aynı anda her yerde bulunabilen hücre büyüme ve farklılaşmasının düzenleyicileridir.

Memeli hücrelerinde ilk olarak tanımlanan MAP kinazlar **ERK** (ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz) ailesi üyesidir. ERK yolağının memeli hücrelerinde merkezi rolü, ilk olarak sıçanlarda sarkomalara neden olan tümör virüslerinin onkogenik proteinleri olarak tanımlanmış olan **Ras** proteinleri (bu yüzden Ras adı, *rat* sarcoma virüsünden gelir) çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır. Ras'a ilgi 1982'de *ras* genlerindeki mutasyonların, insan kanserlerinin gelişimindeki rolüne ilişkin ilk ipuçlarının elde edildiği zaman, önemli derecede yoğunlaştı (Bölüm 19'da ele alındı). Ras'ın hücre içi sinyal iletimindeki önemi, Ras proteininin mikroenjeksiyonunun normal memeli hücre proliferasyonunu direkt olarak uyardığını gösteren deneyler ile doğrulandı. Bunun aksine, ya anti-Ras antikorları ya da dominant negatif Ras mutantı ekspresyonu ile Ras fonksiyonlarının engellenmesi büyüme faktörleri tarafından uyarılan hücre proliferasyonunu bloklamaktadır. Bu yüzden Ras, yalnızca kanser hücrelerinin anormal çoğalma özelliklerini indüklemekle kalmayıp normal hücrelerde büyüme faktörü stimülasyonuna yanıt için de gereklidir.

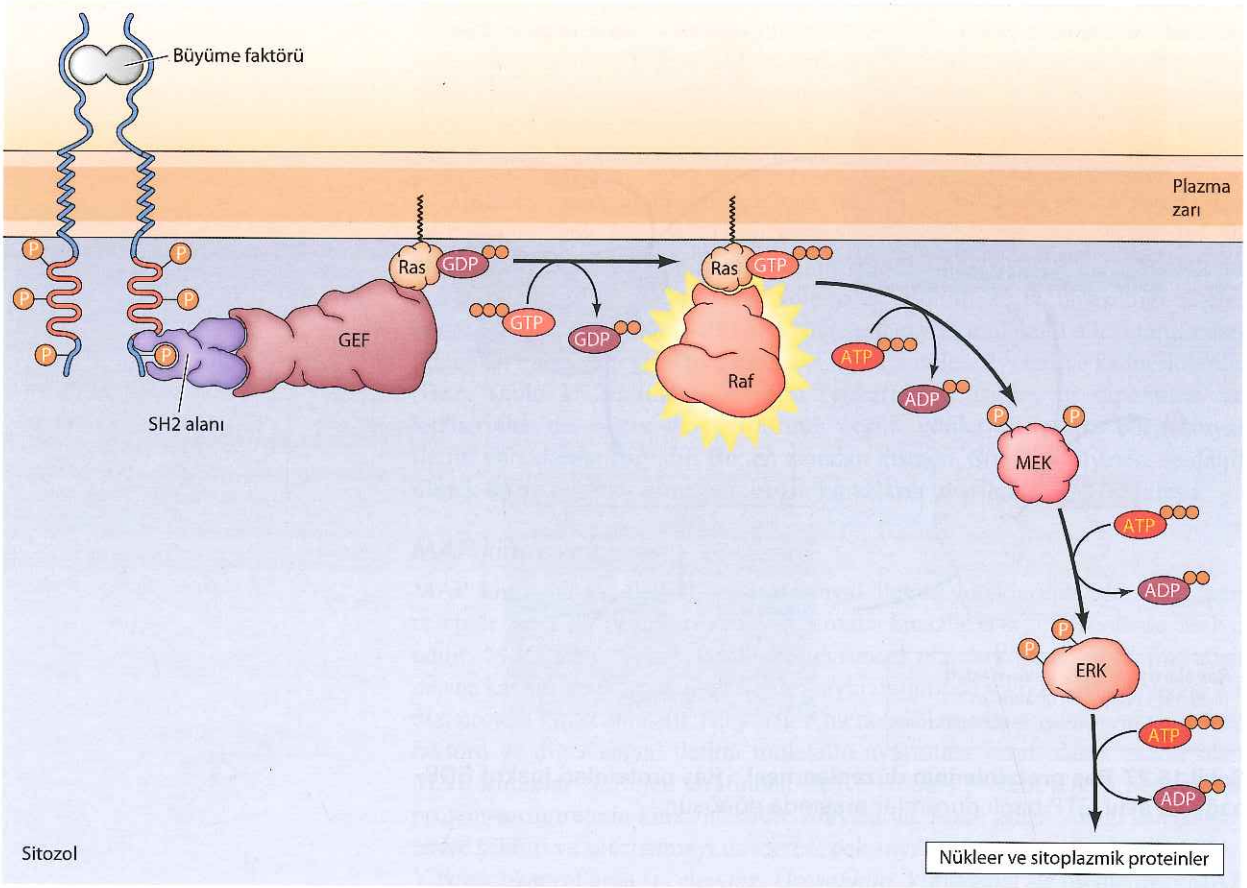
Ras proteinleri, G proteinlerinin α alt birimleri ile benzer işlevleri olan, inaktif GDP-bağlı ve aktif-GTP bağlı form arasında sırayla değişen, guanin nükletid-bağlayan proteinlerdir (**Şekil 16.27**). G proteinlerinin α alt birimlerinin aksine, Ras, $\beta\gamma$ alt birimleriyle etkileşime girmek yerine monomer olarak fonksiyon gösterir. Ras aktivasyonu bağlı GDP'nin salınımını ve



Şekil 16.27 Ras proteinlerinin düzenlenmesi Ras proteinleri inaktif GDP-bağlı ve aktif GTP bağlı durumlar arasında dönüşür.

GTP ile değişimini uyaran **guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF'ler)** tarafından düzenlenir. Bu durumda Ras-GTP kompleksinin aktivitesi GTP hidrolizi ile sonlandırılır. Bu aktivasyon Ras-GTP ile **GTPaz-aktive eden proteinlerin (GAP'lar)** etkileşimi ile uyarılır. İnsan kanserlerindeki *ras* geni mutasyonlarının Ras proteini tarafından GTP hidrolizini inhibe edici etkisi olması ilgi çekicidir. Bu nedenle mutant Ras proteinleri sürekli aktif GTP-bağlı formda kalır ve kanser hücrelerinde büyüme faktörü uyarımı olmaksızın gerçekleşen düzensiz proliferasyona yol açar.

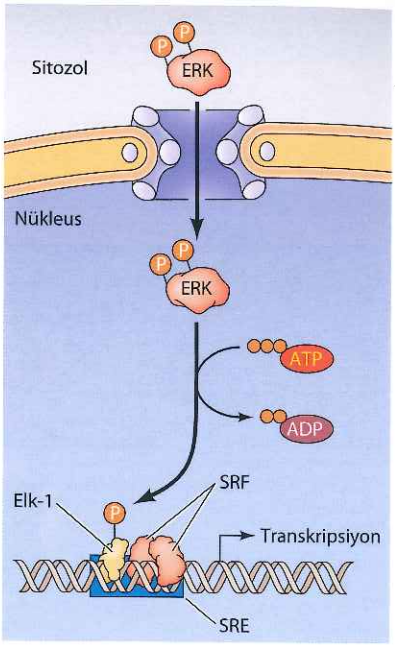
Ras aktivasyonunun en iyi anlaşılan biçimi reseptör protein-tirozin kinazlar tarafından düzenlenir (Şekil 16.28). Bu reseptörlerin otofosforilasyonu, SH2 birimleri ile Ras GEF'lere bağlanmalarına neden olur. Bu GEF'lerin, plazma zarına içeriden karboksi ucuna tutunan lipidlerce bağlanan Ras proteinleri ile etkileşebilecekleri plazma zarına yerleşmelerini sağlar (Bkz. Şekil 14.10). GEF'ler daha sonra GDP'nin GTP ile değişimini uyararak aktif Ras-GTP kompleksinin oluşumuna yol açar. Ras aktif GTP-bağlı formda iken, **Raf** protein-serin/treonin kinazları da içeren çok sayıda efektör protein ile etkileşime girer. Ras ile bu etkileşim Raf'ı plazma zarından sitozole taşır, burada Raf hem dimerleşme hem de fosforilasyon sonucunda aktive edilir. Raf daha sonra, **MEK (MAP kinaz/ERK kinaz)** adı denilen ikinci bir protein kinazı fosforiller ve aktive eder. MEK, ERK ailesi üyelerini bir amino asit farkla, hem treonin hem de tirozin kalıntılarından fosforilleyerek aktive eden, iki yönlü özgüllüğü olan bir protein kinazdır (örn., ERK2 için treonin-183 ve tirozin-185). Bir kez aktive edildiği zaman ERK, diğer protein kinazları ve



Şekil 16.28 Reseptör tirozin kinazların Ras, Raf ve ERK'in aşağı yönünde aktivasyonu Büyüme faktörünün reseptör tirozin kinaza bağlanması, reseptörün otofosforilasyonuna ve guanin nükleotid değişim faktörü (GEF)'nün SH2 biriminin oluşmasına neden olur. Bu etkileşim GEF'i plazma zarına toplar ve burada Ras GDP/GTP değişimini uyarır. Aktive olmuş Ras-GTP daha sonra Raf protein kinaza bağlanır ve Raf aktivasyonuna yol açar. Raf çift yönlü spesifitesi olan bir protein kinaz olan MEK'i fosforiller ve aktive eder, o da ERK'i hem treonin hem de tirozin kalıntılarından (Thr-183 ve Tyr-185) fosforiller ve aktive eder. Daha sonra ERK çekirdekte ve sitozolde çok çeşitli hedef proteinleri fosforiller.

tanskripsiyon faktörlerini içeren birçok farklı hedefi fosforiller.

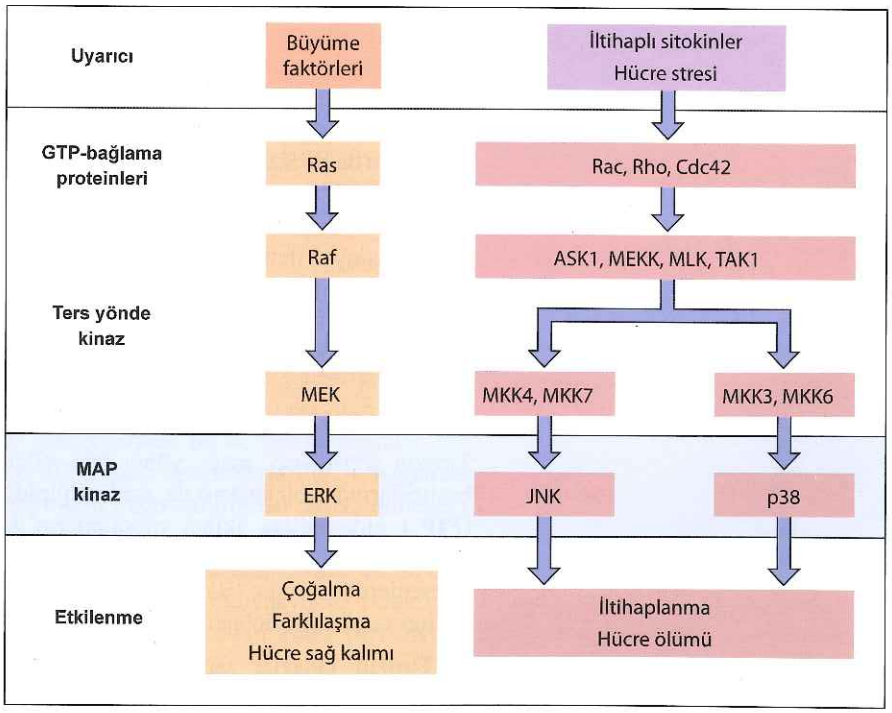
Aktive edilmiş ERK'in bir kısmı, fosforilasyon ile transkripsiyon faktörlerini düzenlediği yer olan nükleusa geçer (Şekil 16.29). Bu bağlamda, büyüme faktörü uyarımına primer yanıt olarak, transkripsiyonları hızla uyarılan yaklaşık 100 gen ailesi **acil-erken genler** olarak adlandırılır. Bir grup acil-erken genin uyarımı, **serum yanıt elemanı (SRE)** olarak adlandırılan ve **serum yanıt faktörü (SRF)** ve **Elk-l** 'i de içeren bir transkripsiyon faktör grubu tarafından tanınan bir düzenleyici dizi aracılığı ile gerçekleşir. ERK Elk-1'i fosforilleyerek aktive etmesi, ERK MAP kinaz ailesi ile acil erken genlerin uyarılması arasında doğrudan bir bağlantı kurar. Çoğu acil-erken genler, transkripsiyon faktörlerini kodlar, böylece bunların büyüme faktörü uyarımına



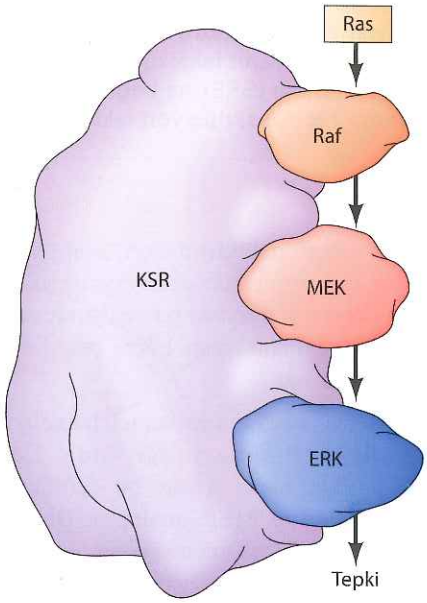
Şekil 16.29 ERK tarafından acil-erken genlerin uyarılması Aktif ERK transkripsiyon faktörü Elk-1'i fosforilleyeceği yer olan çekirdeğe geçer. Elk-1 serum yanıt faktörü (SRF) ile kompleks halinde bulunan serum yanıt elemanı (SRE)'na bağlanır. Fosforilasyon Elk-1'in acil-erken genleri uyaran bir transkripsiyon faktörü olarak aktivite göstermesini sağlar.

yanıt olarak indüklenmeleri, aşağı yöndeki **ikincil yanıt genleri** adı verilen diğer bir grup genin ekspresyonunu değiştirir. Bölüm 17'de tartışıldığı gibi, gen ekspresyonundaki bu değişimler, ERK sinyal iletimi ile büyüme faktörleri tarafından indüklenen hücre proliferasyonunun uyarımı arasında doğrudan bağlantı kurar.

Hem maya, hem de memeli hücrelerinde farklı hücresel yanıtları düzenleyen birçok MAP kinaz yolağı vardır. Her yolak kendi aktivitesini düzenleyen üç protein kinaz içerir: bir terminal MAP kinaz ve iki yukarı yöndeki kinaz (Raf ve MEK analoğu). Bir maya olan *S.cerevisiae*'da, döllenmeyi, sporulasyonu, filamentasyonu, hücre duvarı yeniden düzenlenmelerini ve yüksek ozmolariteye yanıtı düzenleyen beş farklı MAP kinaz yolağı vardır. Memeli hücrelerinde, çok sayıda MAP kinaz grubu tanımlanmıştır. ERK ailesi üyelerine ek olarak, tercihan iflamatuar sitokinlere ve hücresel strese (örn., ultraviyole ışınları) yanıt olarak aktive edilen JNK ve p38 MAP kinazları içerir (Şekil 16.30). JNK ve p38 MAP kinaz yolakları, Ras tarafından değil de, Rho adlı küçük GTP-bağlayan protein alt ailesi üyeleri (Rae, Rho ve Cdc42'yi içeren) tarafından aktive edilir. ERK sinyal iletimi öncelikli olarak hücre proliferasyonu, sağ kalımı ve farklılaşmasına yol açarken, JNK ve p38 MAP kinaz yolakları sıklıkla inflamasyon ve hücre ölümüne neden olur. ERK



Şekil 16.30 Memeli hücrelerinde MAP kinaz aktivasyon yolakları Memeli hücrelerinde ERK'e ek olarak, JNK ve p38 MAP kinazlar da vardır. JNK ve MAP kinazların aktivasyonu ERK aktivasyonundan sorumlu protein kinaz yolağı ile paralel olarak düzenlenir. JNK ve p38 MAP kinaz aktivasyonuna yol açan protein kinaz yolağı, tercihen inflamatuar sitokinler ile hücresel stres genleri tarafından aktive edilir ve inflamasyon ve hücre ölümü ile sonuçlanır.



Şekil 16.31 ERK MAP kinaz yolağındaki bir iskele proteini KSR iskele proteini Raf, MEK ve ERK'e bağlanır, ERK MAP kinaz yolağının bu elemanlarını bir sinyal taşıyıcısı içinde düzenli olarak tutar.

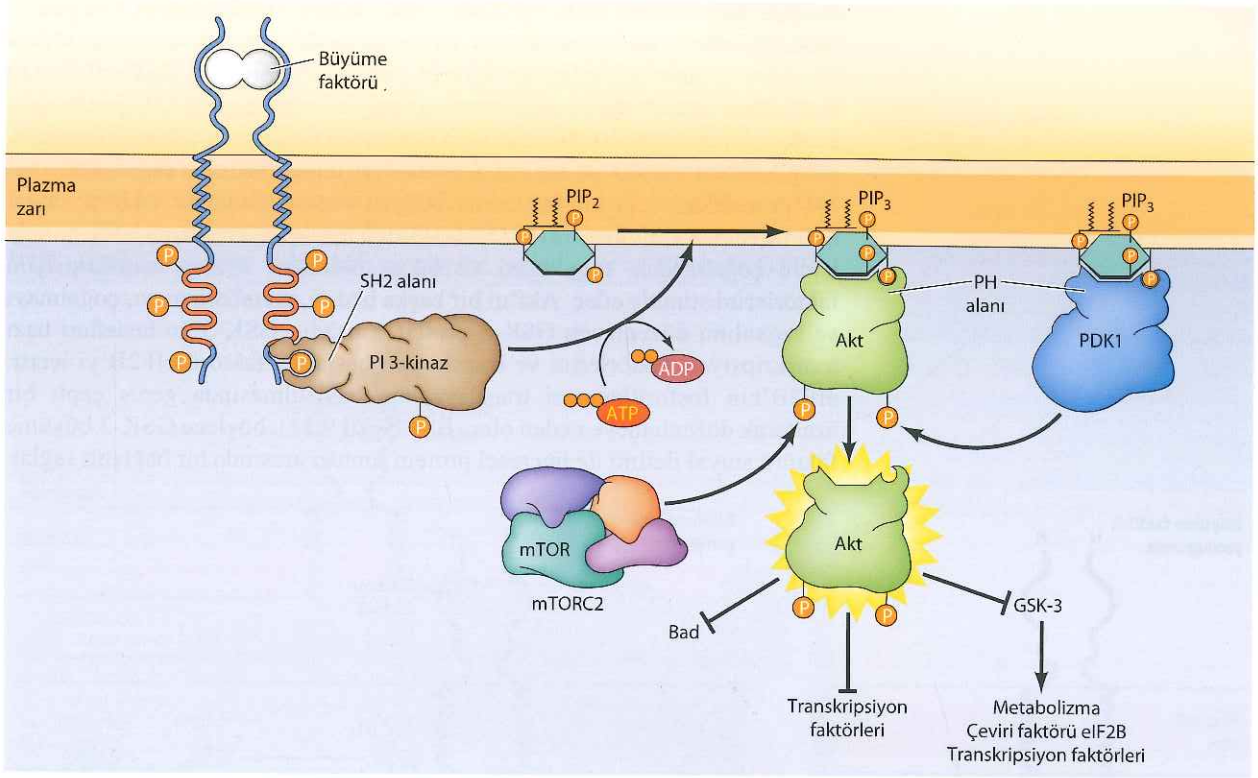
gibi, JNK ve p38 MAP kinazlar da nükleusa geçebilir ve gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerini fosforilleyebilir. Bu nedenle her tip ökaryot hücrede farklı çevresel sinyallere karşı hücresel yanıtları kontrol eden birçok MAP kinaz yolağı vardır.

MAP kinaz sinyal iletiminin özgüllüğü, en azından kısmen, her MAP kinaz yolağı bileşeninin, sinyal molekülü komplekslerini organize eden **yapı iskelesi proteinleri** ile bağlantılı kompleksler halinde düzenlenmesi ile sağlanır. Örneğin KSR yapı iskelesi proteini bir sinyal kaseti oluşturarak, ERK'i ve onun yukarı yöndeki aktivatörleri olan Raf ile MEK'i düzenler (Şekil 16.31). KSR iskelesi üzerindeki bu protein kinazların spesifik etkileşimleri sonucunda, Raf'ın Ras tarafından aktivasyonu, MEK'i spesifik ve etkili o şekilde aktive eder ve bu da ERK aktivasyonu sağlar. ERK, MEK tarafından fosforillenmesini takiben, KSR'den ayrılır ve nükleusa geçer. Farklı iskele proteinleri yalnızca MAP kinaz sinyal taşıyıcılarının düzenlenmesi ile ilgili olmayıp ayrıca aşağı yöndeki sinyal iletimi moleküllerinin reseptörleri ve hedefleri ile ilişkisinde de rol alır. Sinyal iletimi yolaklarındaki bileşenlerin iskele proteinleri aracılığı ile fiziksel olarak bağlanmaları, hücre içindeki sinyal iletim yolaklarının spesifitesinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

PI 3-kinaz/Akt ve mTor yolakları

Tirozin kinazların aşağı yönündeki hücre içi sinyal iletimi yolaklarının başlıcalarından bir başkası da, zar fosfolipidi **fosfatidilinositol 4,5-bisfosfattan (PIP_2)** elde edilen ikinci mesajcıların kullanımına dayanmaktadır. PIP_2, plazma zarındaki çift tabaka fosfolipidlerin iç bölümünde yerleşmiş olan bileşenlerden biridir (Bkz. Şekil 14.2). PIP_2, **fosfatidilinositid (PI) 3-kinaz** enzimi tarafından üçüncü pozisyondaki inositolünden fosforillenir.

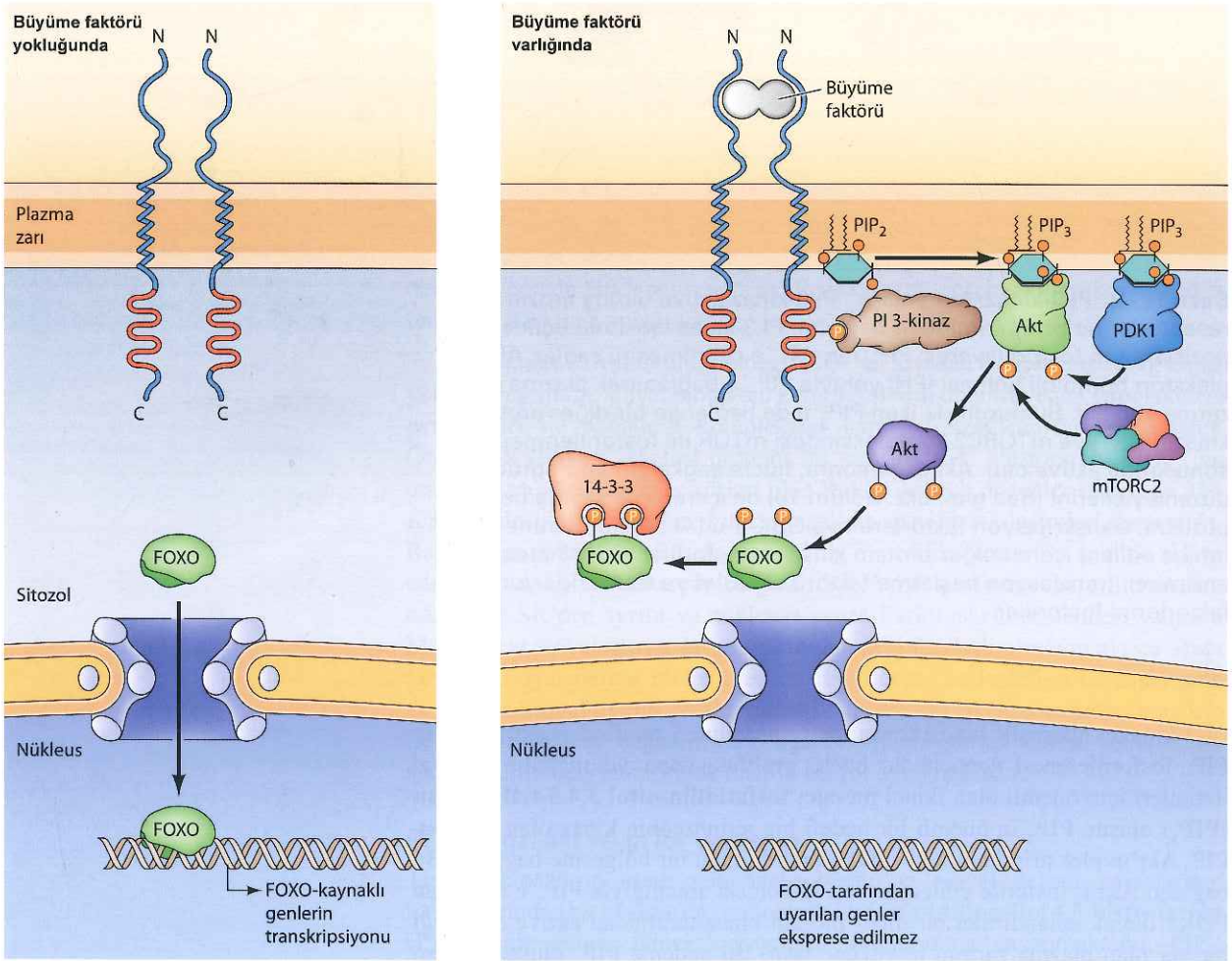
Tirozin kinazlar tarafından aktive edilen PI 3-kinazın SH2 bölgesi vardır ve reseptör tirozin kinazlar ile bağlanarak aktive olur (Şekil 16.32).



Şekil 16.32 PI 3-kinaz/Akt yolağı PI 3-kinaz aktive olmuş tirozin kinaz reseptörlerine SH2 biriminden bağlanır. PI 3-kinaz inositolü üçüncü pozisyondan fosforilleyerek, PIP_2'nin PIP_3'e çevrilmesini sağlar. Akt, plekstrin homoloji bölgesi (PH) yoluyla PIP_3'e bağlanarak plazma zarına yerleşir. Bu durumda iken PIP_3'e de bağlanan bir diğer protein kinaz (PDK1) ve mTORC2 kompleksindeki mTOR ile fosforillenmesi sonucunda aktive olur. Akt daha sonra, hücre sağkalımının doğrudan düzenleyicilerini (Bad gibi, bkz. Bölüm 18) de içeren çok sayıda hedef proteini, transkripsiyon faktörlerini ve GSK-3'ü (Akt fosforillenmesi ile inhibe edilen) içeren diğer protein kinazları fosforiller. GSK-3 metabolik enzimleri, translasyon başlatma faktörü eIF2B'yi ve transkripsiyon faktörlerini fosforiller.

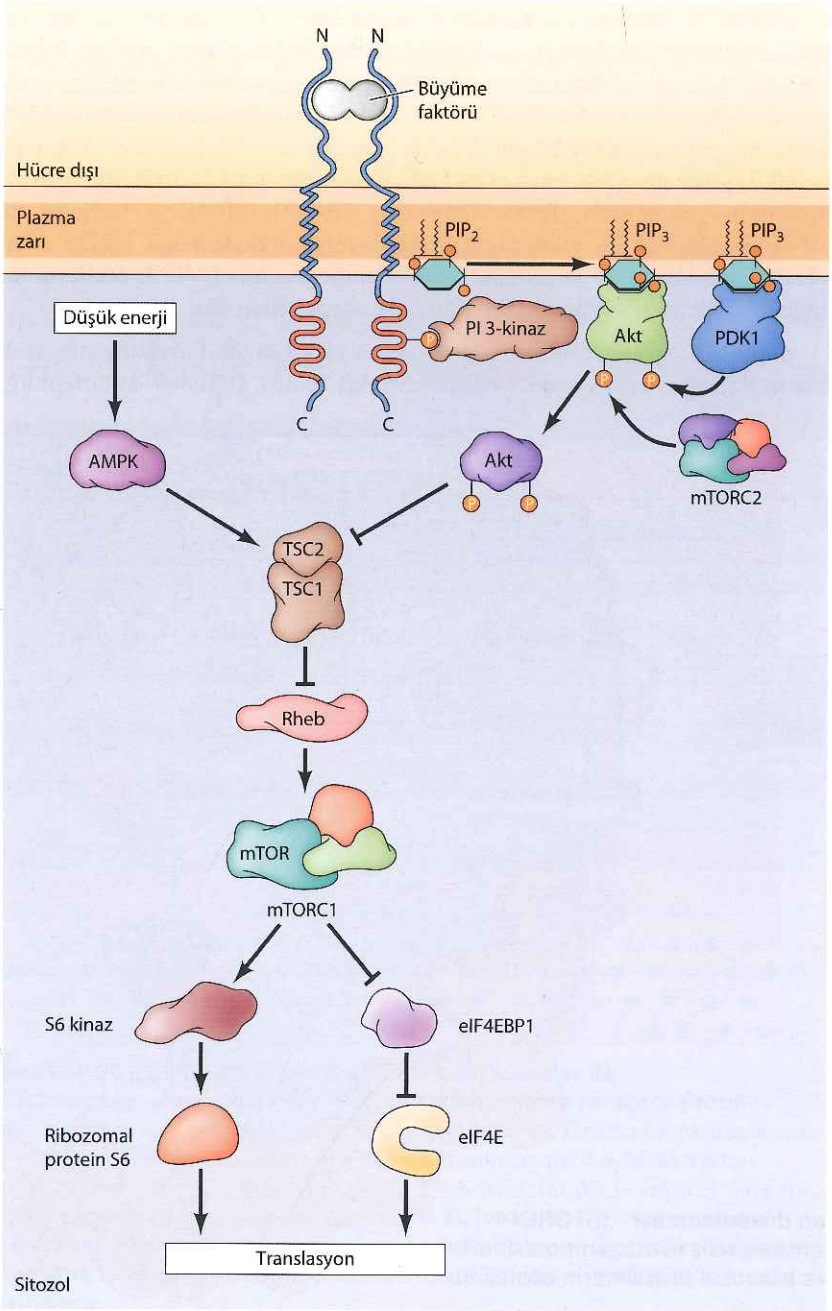
PI 3-kinazın alternatif bir izoformu da G proteinleri tarafından aktive edilir. PIP_2 fosforillenmesi sonucunda, hücre proliferasyonu ve sağkalımı sinyal iletimleri için önemli olan ikinci mesajcı **fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfattan** (**PIP_3**) oluşur. PIP_3'in önemli bir hedefi bir serin/treonin kinaz olan **Akt**'dır. PIP_3 Akt'ın plekstrin homoloji (PH) olarak bilinen bir bölgesine bağlanır. Bu bağlantı Akt'ı, fosforile edileceği ve PH bölgesi aracılığıyla PIP_3'e bağlanan PDK1 olarak adlandırılan bir diğer protein kinaz tarafından aktive edileceği bir yer olan plazma zarının iç yüzüne taşır. Bu nedenle PIP_3 oluşumu, hem Akt'ın hem de PDKI'in plazma zarı ile etkileşimi ile sonuçlanır, bu da Akt fosforilasyonuna ve aktivasyonuna yol açar. Akt aktivasyonu, ikinci bir bölgede, büyüme faktörleri ile uyarılan başka bir protein kinaz (mTORC2) tarafından fosforillenmeyi gerektirir.

Bir kere aktif hale gelince Akt, hücre sağkalımının doğrudan düzenleyicileri (Bad gibi, Bölüm 18'de tartışıldı), transkripsiyon faktörleri ve diğer protein kinazları da içeren çok sayıda proteini fosforiller. Akt tarafından hedeflenen önemli transkripsiyon faktörleri FOXO ailesinin üyelerini içerir (Şekil 16.33). FOXO'nun Akt tarafından fosforillenmesi, sitoplazmada FOXO'yu inaktif formda ayrı tutan sitozolik şaperonlar (14-3-3 proteinleri) için bir bağlanma bölgesi yaratır. Büyüme faktörü sinyal iletimi ve Akt aktivitesi , FOXO 14-3-3'den ayrılıp nükleusa geçerek burada hücre çoğalmasını engelleyen ve hücre ölümünü uyaran transkripsiyon faktörlerini stimüle eder. Akt'ın bir başka hedefi, metabolizmayı, çoğalmayı ve sağkalımı düzenleyen GSK-3 protein kinazdır. GSK-3'ün hedefleri bazı transkripsiyon faktörlerini ve translasyon başlatma faktörü eIF2B'yi içerir. eIF2B'nin fosforillenmesi translasyonun başlatılmasında geniş çaplı bir azaltarak düzenlemeye neden olur (Bkz. Şekil 9.21), böylece GSK-3 büyüme faktörü sinyal iletimi ile hücresel protein sentezi arasında bir bağlantı sağlar.



Şekil 16.33 FOXO'nun düzenlenmesi Büyüme faktörü uyarımının yokluğunda, FOXO transkripsiyon faktörü nükleusa geçer ve hedef gen ekspresyonunu başlatır. Büyüme faktörü uyarımı, FOXO'yu fosforilleyen Akt'nin aktivasyonuna yol açar. Bu da sitoplazmada FOXO'yu inaktif halde tutan sitozolik şaperon 14-3-3 için bağlanma bölgeleri yaratır.

mTOR yolağı hücre büyümesinin merkezi bir düzenleyicisi olup protein sentezinin kontrolünü büyüme faktörleri, besinler ve enerji ile eşleştirir (**Şekil 16.34**). Bu mTOR yolağının, PI 3-kinaz/Akt yolağını da içeren çok sayıda sinyalin düzenlenmesi ile başarılır. mTOR protein kinaz hücrelerde iki farklı kompleksin içinde bulunur. Yukarıda tartışıldığı gibi, mTORC2 kompleksi Akt'ı fosforilleyen ve aktive eden protein kinazlardan biridir (Bkz. Şekil 16.32). Buna karşılık, mTORC1 kompleksi Akt'ın aşağı yönünde aktive edilir ve protein sentezini düzenlemede rol alır. mTORC1, Ras-benzeri GTP-bağlayan protein olan Rheb tarafından düzenlenir ve Rheb de GTPaz-



Şekil 16.34 mTOR yolağı Akt TSC1/2 kompleksini inhibe ederek büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak Rheb ve mTORC1'in aktivasyonuna yol açar. Buna karşılık AMPK, hücresel enerji depoları boşaldığında TSC1/2 kompleksini aktive ederek Rheb ve mTORC1'in inhibe edilmesine neden olur. mTORC1 S6 kinazı (ribozomal protein S6'yı fosforiller) ve eIF4E bağlayan protein-1'i (4E-BP1) fosforilleyerek translasyonu uyarır ve translasyonu başlatma faktörü eIF4E'nin engellenmesini kaldırır.

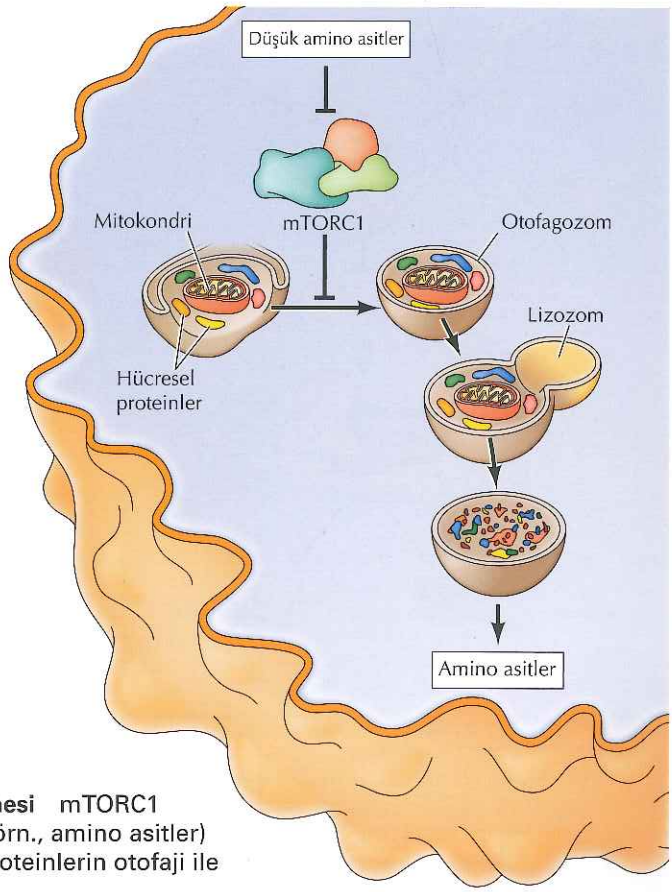
Bilgi İçin

Bir bakteriden elde edilen antibiyotik olan Rapamisin, mTORC1 kompleksinin spesifik inhibitörüdür ve organ nakillerinde immün-baskılayıcı ilaç olarak kullanılır.

aktifleştirici protein kompleksi TSC1/2'yi (TSC1 ve TSC2 alt birimlerinden oluşur) tarafından düzenlenir. Akt TSC1/2'nin aktivitesini fosforilleyerek engeller ve mTORC1'in büyüme faktörü stimulasyonuna yanıt olarak aktive olmasına neden olur. Ayrıca TSC1/2 bir başka protein kinaz olan AMP-ile-aktifleştirilen kinaz (AMPK) tarafından düzenlenir. AMPK hücrenin enerji düzeyini sezerek yüksek AMP/ATP oranında aktive edilir. Bu koşullar altında AMPK TSC1/2'yi fosforilleyerek aktifleştirir ve bu da hücresel enerji depoları boşaldığında mTORC1'in inhibisyonuna yol açar. mTORC1, ek olarak, kendi aktivitesi için gerekli olan amino asitlerin mevcut olma durumu ile de düzenlenir.

mTORC1, protein sentezini düzenlemede rol alan en az iki iyi tanımlanmış hedefi fosforiller: S6 kinaz ve eIF4E-bağlayan protein-1 (4E-BP1). S6 kinaz, ribozomal protein S6'yı ve translasyonel düzenlenmede yer alan diğer proteinleri fosforilleyerek translasyonu kontrol eder. eIF4E bağlayan protein, mRNA'ların 5′ ucuna bağlanan başlatma faktörü eIF4E ile etkileşerek translasyonu kontrol eder (Bkz. Şekil 9.22). mTORC1 sinyal iletiminin yokluğunda, fosforillenmemiş 4E-BP1, eIF4E'ye bağlanır ve eIF4E'nin eIF4G ile etkileşimini engelleyerek translasyonu inhibe eder. 4E-BP1'nin mTORC1 tarafından fosforillenmesi onun eIF4E ile etkileşimini engelleyerek translasyon başlama hızında artışa neden olur.

mTORC1, protein sentezini uyarmasının yanı sıra, otofajiyi düzenleyerek hücresel proteinlerin yıkımını engeller (**Şekil 16.35**). Bölüm 9'da tartışıldığı

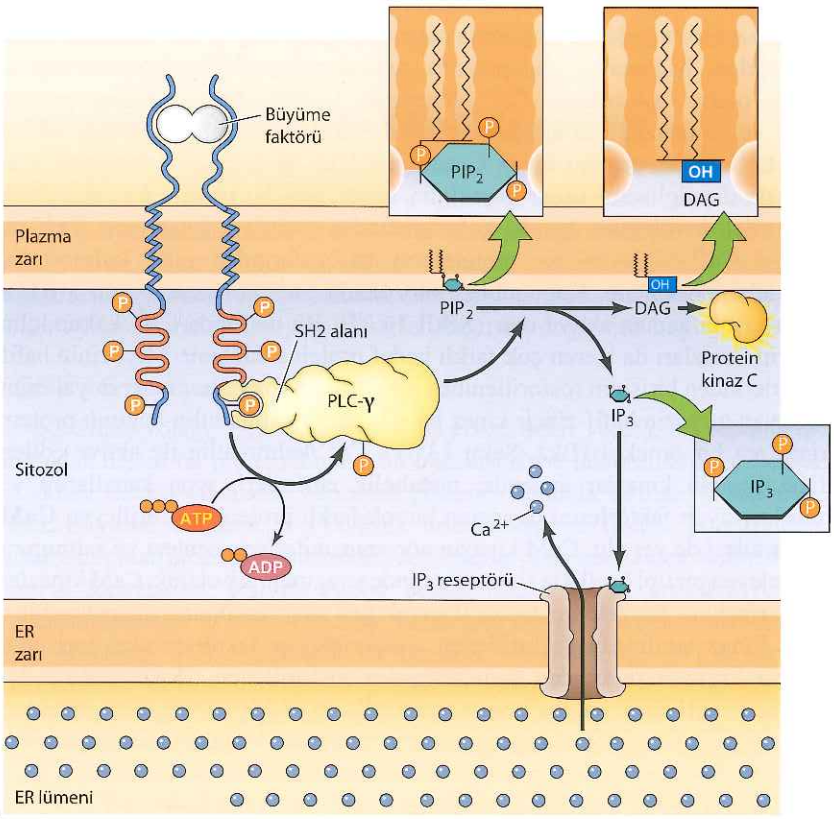


Şekil 16.35 Otofajinin mTOR tarafından düzenlenmesi mTORC1 protein kinaz otofajiyi engeller. Bir hücre besinsiz (örn., amino asitler) bırakıldığında, mTORC1 inhibe edilir ve hücresel proteinlerin otofaji ile yıkımı amino asit kaynağı sağlar.

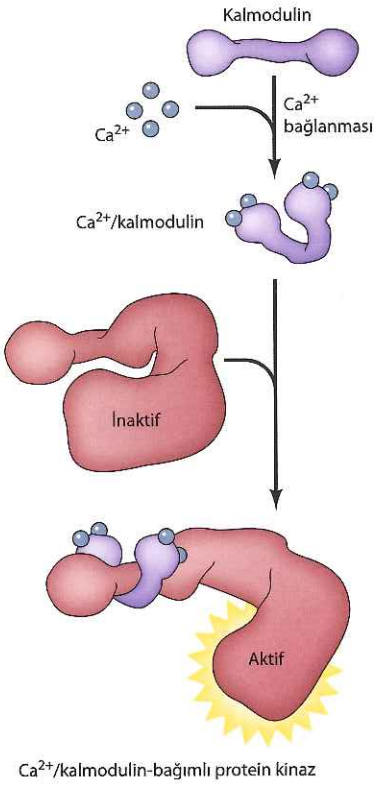
gibi, otofaji hücresel proteinlerin lizozomlara alınması ile yıkımına neden olur (Bkz. Şekil 9.48). Hücreler besince (örn., amino asitler) aç kaldıklarında, mTORC1 aktivitesi düşerek otofajiyi uyarır ve hücrelerin hayati olmayan proteinleri amino asitlerini tekrar kullanabilmek için yıkıma uğratmalarına izin verir.

Fosfolipaz C ve Ca^{2+}

Hücre içi sinyal iletiminin bir başka ana yolağı, hem tirozin kinazların hem de G-protein eşlikli reseptörlerin aşağı yönünde aktive edilir ve PIP_2'nin **fosfolipaz C (PLC)** tarafından **diasilgliserol (DAG)** ve **inozitol 1,4,5-trifosfat (IP_3)** adlarında iki farklı ikinci mesajcı oluşacak şekilde hidrolizine dayanır (**Şekil 16.36**). Tirozin kinazların aşağı yönünde aktive olan fosfolipaz C'nin bir tipi (PLC-γ), aktif reseptör tirozin kinazlar ile bağlanmasını düzenleyen SH2 bölgeleri içerir. Bu etkileşim PLC-γ'nın plazma zarına yerleşmesine, aynı zamanda katalitik aktivitesini artıran tirozin fosforilasyonuna yol açar. DAG ve IP_3 daha sonra aşağı yöndeki farklı sinyal iletimi yolaklarını (sırasıyla



Şekil 16.36 Fosfolipaz C'nin protein-tirozin kinazlar ile aktivasyonu Fosfolipaz C-γ (PLC-γ) aktive edilmiş reseptör protein-tirozin kinazlara SH2 bölgesi aracılığı ile bağlanır. Tirozin fosforilasyonu PLC-γ' nın aktivitesini artırır, bu da fosfatidilinositol 4,5-bisfosfattan (PIP_2) diasilgliserol (DAG) ve inozitol 1,4,5-trifosfat (IP_3) hidrolizini uyarır. DAG protein kinaz C ailesinin üyelerini aktive eder. IP_3, endoplazmik retikulum zarında ligand-kapılı Ca^{2+} kanalları olan reseptörlere bağlanır. Bu kanalların açılması endoplazmik retikulumdan sitozole Ca^{2+} akışına izin verir.



Şekil 16.37 Kalmodulinin görevi Kalmodulin, dört adet Ca^{2+} bağlama bölgesi olan, davul tokmağı şeklinde bir proteindir. Aktif Ca^{2+}/kalmodulin kompleksi, Ca^{2+}/kalmodulin bağımlı protein kinaz gibi çok sayıda hedef proteine bağlanır.

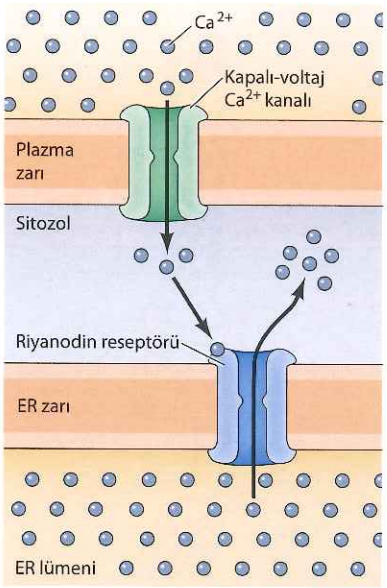
protein kinaz C ve Ca^{2+} hareketi) uyarır, bundan dolayı PIP_2 hidrolizi hücre-içi sinyal iletiminde iki-kollu bir yolağı tetikler.

PIP_2 hidrolizi ile üretilen diasilgliserol plazma zarına bitişik olarak kalır ve **protein kinaz C** ailesinde yer alan, hücre büyüme ve farklılaşmasının kontrolünde önemli roller oynayan, serin/treonin kinazları aktive eder. PIP_2 kesimi ile oluşan ve sitozole salınan küçük bir polar molekül olan bir diğer ikinci mesajcı IP_3, hücre içi depolardan Ca^{2+} salınım sinyalleri oluşturur. Bölüm 14'te de belirtildiği gibi, Ca^{2+}'un hücreden dışarıya Ca^{2+} pompaları aracılığıyla aktif olarak atılımı sonucunda, sitozoldeki Ca^{2+} konsantrasyonu çok düşük düzeyde tutulur (0.1 μM kadar). Ca^{2+} yalnızca plazma zarının öbür yanına değil aynı zamanda hücre içi Ca^{2+} deposu olarak işlev gören endoplazmik retikuluma da pompalanır. IP_3 ligand-kapılı Ca^{2+} kanalları olan reseptörlere bağlanarak endoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımını sağlar. Sonuç olarak, sitozoldeki Ca^{2+} düzeyinin 1 μM'a kadar artması protein kinaz ve fosfatazları da içeren çok sayıda farklı hedef proteinin aktivitesini etkiler. Örneğin, protein kinaz C ailesinin bazı üyelerinin aktivasyonu için Ca^{2+} da diasilgliserol kadar gereklidir, bu yüzden bu protein kinazlar PIP_2 sinyal iletim yolağının her iki kolu tarafından ortaklaşa düzenlenir. Ca^{2+}'un etkileri Ca^{2+}-bağlayan bir proteinlerin başlıcalarından olan **kalmodulin** tarafından düzenlenir. Kalmodulin, sitozoldeki Ca^{2+} konsantrasyonu 5 μM'a kadar arttığı zaman aktive olur (**Şekil 16.37**). Bu durumda Ca^{2+}/kalmodulin protein kinazları da içeren çok farklı hedef proteine bağlanır. Miyozinin hafif zincirlerinden birisinin fosforillenmesi ile aktin-miyozin kasılması sinyallerini sağlayan miyozin hafif-zincir kinaz bu gibi Ca^{2+}/ kalmodulin-bağımlı protein kinazlara bir örnektir (Bkz. Şekil 13.31). Ca^{2+}/kalmodulin ile aktive edilen diğer protein kinazlar arasında, metabolik enzimleri, iyon kanallarını ve transkripsiyon faktörlerini de içeren birçok farklı proteini fosforilleyen **CaM kinaz** ailesi de yer alır. CaM kinazın nörotransmiterlerin sentezi ve salınımını düzenleyen bir tipi özellikle sinir sisteminde yaygındır. Ek olarak, CaM kinazlar transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek gen ekspresyonunu düzenleyebilir. CaM kinaz tarafından fosforillenen transkripsiyon faktörlerinden birisinin, protein kinaz A tarafından aynı bölgeden fosforillenen CREB olması ilgi çekicidir. CREB'in bu fosforilasyonu Ca^{2+} ve cAMP sinyal ileti yolakları arasında birçok kesişme olduğunu gösterir. Bu konudaki diğer örnekler; adenilil siklaz ve fosfodiesterazların Ca^{2+}/kalmodulin tarafından düzenlenmesi, Ca^{2+} kanallarının cAMP aracılığı ile düzenlenmesi ve çok sayıdaki hedef proteinin hem protein kinaz A, hem de Ca^{2+}/kalmodulin- bağımlı protein kinaz tarafından fosforillenmesidir. Bu yüzden birçok hücresel yanıtın düzenlenmesinde cAMP ve Ca^{2+} sinyal ileti yolakları koordine olarak çalışır.

Hücre içi Ca^{2+} artışı yalnızca Ca^{2+}'un hücre içi depolardan salınımından değil ayrıca hücre dışındaki Ca^{2+}'un da plazma zarından kontrollü kanallar ile alımından kaynaklanabilir. Hücre-dışı Ca^{2+}'un girişi sinir ve kas gibi elektriksel olarak uyarılabilir hücreler için özellikle önemlidir. Bu hücrelerdeki voltaj-kapılı Ca^{2+} kanalları zar depolarizasyonu ile açılır (**Şekil 16.38**). Hücre içi Ca^{2+}

Bilgi İçin

Toksik yılan zehirleri fosfolipazlara sahiptir. Fosfolipidlerin çıngıraklı yılan ve kobra zehiri ile hidrolizi, kırmızı kan hücrelerinin zarlarının hidrolizine yol açar.



Şekil 16.38 Elektrikle uyarılabilen hücrelerde, hücre içi Ca^{2+}'un düzenlenmesi Zardaki depolarizasyon, voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının açılmasına yol açar, bu da ekstraselüler sıvılardan hücre içine Ca^{2+} girişine neden olur. Hücre içi Ca^{2+}'un artması sonucunda, endoplazmik retikulum zarındaki farklı Ca^{2+} kanallarının (riyanodin reseptörleri) açılması yoluyla hücre içi depolardan daha fazla Ca^{2+} salınım sinyalleri iletilir. Kas hücresinde, sarkoplazmik retikulumdaki riyanodin reseptörleri zar depolarizasyonuna yanıt olarak, direkt olarak da açılabilir.

konsantrasyonunun artması sonucunda **riyanodin reseptörleri** olarak bilinen farklı Ca^{2+} kanallarının aktivasyonu ile, hücre-içi depolardan daha da fazla Ca^{2+} salınımı tetiklenir. Nöronlarda, hücre-içindeki Ca^{2+} konsantrasyonundaki artışın bir etkisi nörotransmiterlerin salınımıdır, bu nedenle Ca^{2+} sinir sisteminde elektriksel sinyallerin kimyasal sinyallere çevrilmesinde kritik rol oynar. Kas hücrelerinde Ca^{2+} sarkoplazmik retikulumda depolanır, buradan zar potansiyelindeki değişimlere yanıt olarak riyanodin reseptörlerinin açılması ile dışarı salınır. Depolanmış Ca^{2+}'un salınımı sitozoldeki Ca^{2+} konsantrasyonunun çok fazla artmasına yol açar, bu da kas kasılmasını tetikler (Bkz. Şekil 13.28). Hücreler bu yüzden, hücre içi Ca^{2+} düzeyini düzenlemek için birçok farklı mekanizma kullanır ve düzeyi hızla değişen bir ikinci mesajcı olarak Ca^{2+} çok sayıda hücresel süreci kontrol eder.

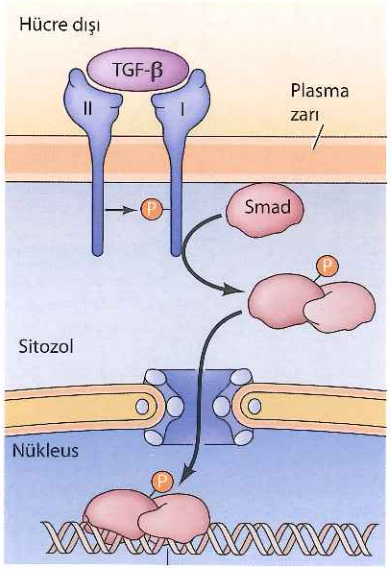
Transkripsiyon Faktörleri ile Eşlenik Reseptörler

cAMP, MAP kinaz ve PI 3-kinaz yolakları, hücre yüzeyi ile nükleus arasındaki, ikincil mesajcıların ve protein kinazların son aşamada transkripsiyon faktörü fosforilasyonuna neden olduğu, indirekt bağlantıların örnekleridir. Bazı diğer büyüme faktörü reseptörleri (bu kısımda tartışılacaktır), hücre çoğalmasında, farklılaşmasında ve sağkalımında kilit roller oynayan transkripsiyon faktörleri ile daha doğrudan bağlantılıdır.

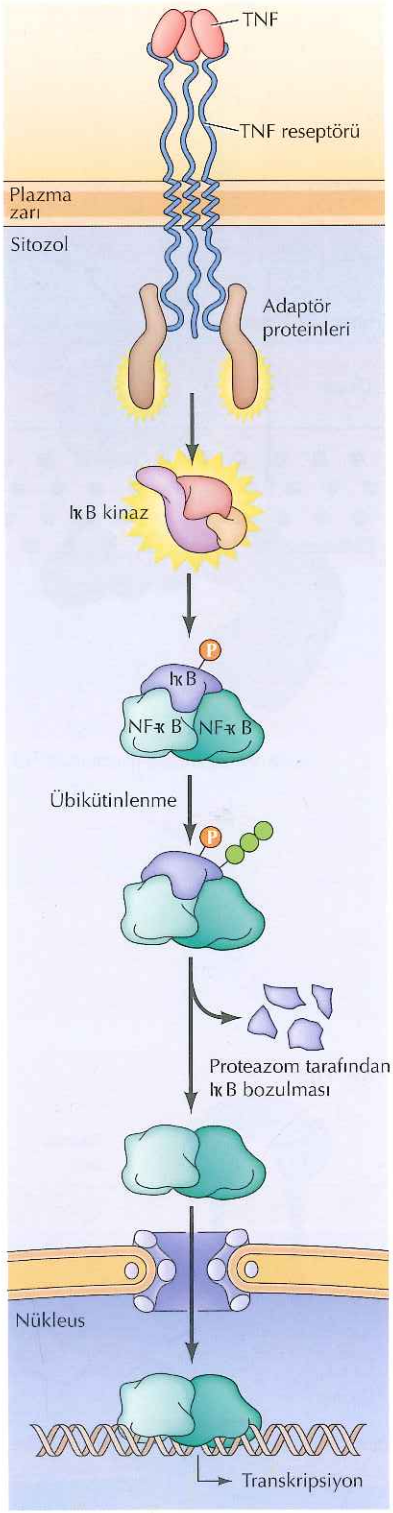
TGF-β / Smad yolağı

TGF-β/Smad yolağı, JAK/STAT yolağına (Bkz. Şekil 16.25), bir reseptör ile doğrudan ilişkili bir protein kinazın bir transkripsiyon faktörünü fosforillemesi ve aktive etmesi yönünden benzerlik gösterir. Bununla birlikte, **transforme edici büyüme faktörü β (TGF-β)** reseptörleri ve ilişkili polipeptidler, substratları olan proteinleri tirozinden değil, serin ya da treoninden fosforilleyen protein kinazlardır. TGF-β, birçok çeşitli hücre tipinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını kontrol eden bir polipeptid büyüme faktörü ailesinin en tipik örneğidir. TGF-β ailesinin bir üyesinin reseptörünün 1991'de ilk kez klonlanması, sitozolde protein-serin/treonin kinaz bölümüne sahip yeni bir reseptör ailesinin prototipi olduğunu gösterdi. O zamandan beri, diğer TGF-β ailesi üyelerinin reseptörlerinde de benzer protein-serin/treonin kinazlar olduğu bulundu.

TGF-β reseptörleri, ligandın bağlanmasının ardından birleşen iki farklı tipteki polipeptidden (tip I ve tip II olarak adlandırılan) oluşur (**Şekil 16.39**). Tip I reseptörü tip II reseptörünü fosforiller ve tip II reseptörü de sonrasında



Şekil 16.39 TGF-β reseptörlerinden sinyal iletimi TGF-β reseptörleri tip I ve II polipeptidlerin dimerleridir. Tip II reseptörü tip I'i fosforilleyerek aktive eder ve tip I'de daha sonra Smad proteinini fosforiller. Fosforillenmiş Smad'lar kompleksler oluşturur ve nükleusa geçerek hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder.



Şekil 16.40 TNF reseptöründen NF-κB sinyal iletimi İnaktif dönemde, uyarılmamış hücrelerde NF-κB proteinleri, kendilerini sitoplazmada inaktif bir halde tutan inhibe edici 1κB proteinleri ile bağlıdır. TNF'nin (üç polipeptit zincirlerinden oluşan) ve Toll-benzeri reseptörlerin aktivasyonu, 1κB'yi fosforilleyen 1κB kinazı aktifleştiren adaptör proteinlerin toplanmasına neden olur. Bu fosforillenme 1κB'yi übikütinlenmeye ve proteazom tarafından yıkıma uğratarak NF-κB'yi nükleusa geçmesi ve hedef genlerin ekspresyonunu uyarması için serbest bırakır.

Smad ailesi transkripsiyon faktörlerini fosforiller. Fosforillenmiş SMAD'lar nükleusa geçen ve hedef genlerin ekspresyonunu uyaran komplekler oluşturur. İnsanlarda TGF-β ailesinin hedef hücrelerinde farklı yanıtlara neden olan en az 30 farklı üyesi olması dikkate değerdir. Bu yedi farklı tip I reseptörünün beş tip II reseptörü ile kombinasyonel etkileşimleri farklı Smad ailesi üyelerinin (toplam sekiz aile üyesi) aktivasyonu ile sonuçlanır.

NF-κB sinyal iletimi

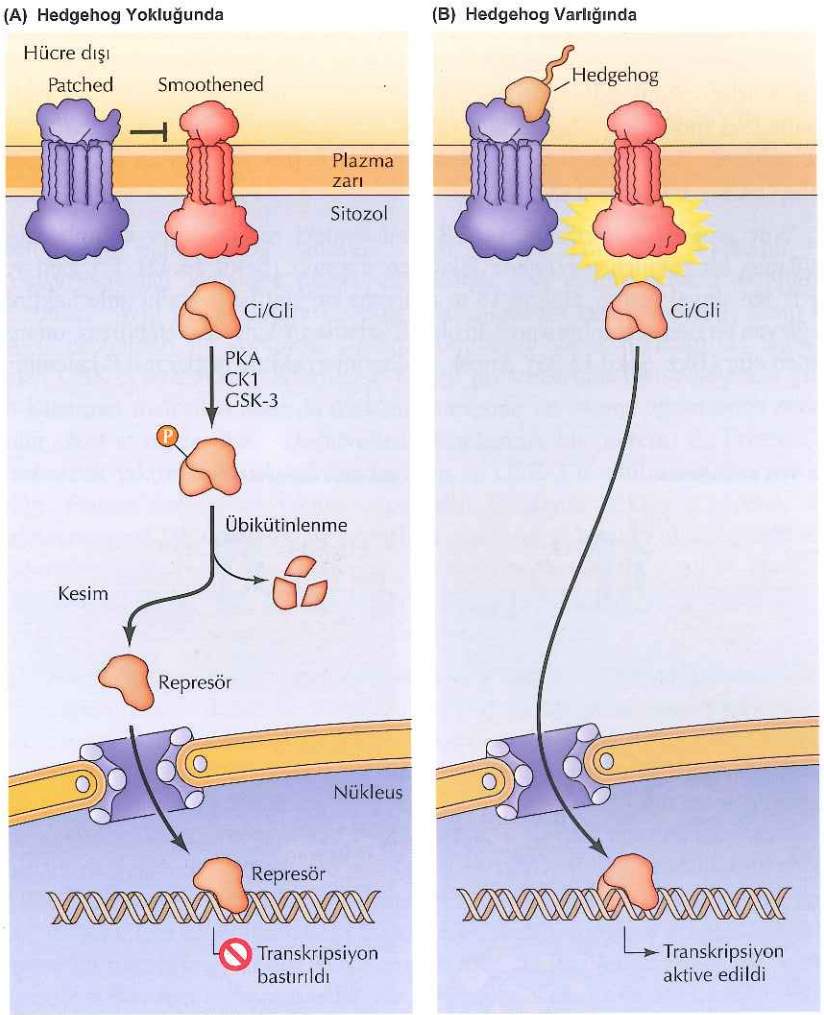
NF-κB sinyal iletimi spesifik bir transkripsiyon faktörü ailesini hedefleyen, bu defa inhibe edici bir bölgenin übikitinlenmesini ve yıkımını uyaran, bir sinyal iletim yolağı örneğidir. **NF-κB** ailesi, immün sistemdeki ve enflamasyondaki rollerinin yanı sıra pek çok çeşit hayvan hücresinin çoğalmasında ve sağkalımında kilit rollere sahip beş transkripsiyon faktöründen oluşur. Bu transkripsiyon faktör ailesinin üyeleri, büyüme faktörleri, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar ve DNA hasarı da içeren çeşitli uyaranlara yanıt olarak aktive edilir.

NF-κB aktivasyonuna neden olan sinyal iletim yolakları, özellikle de, enflamasyonu ve hücre ölümünü uyaran bir sitokin olan **tümör nekroz faktörü (TNF)** reseptörünün ve patojen bakteriler ve virüsler ile ilişkili çeşitli molekülleri tanıyan **Toll-benzeri reseptörlerin** aşağı yönünde iyi çalışılmıştır. Uyarılmamış hücrelerde NF-κB proteinleri, kendilerini sitoplazmada inaktif bir halde tutan inhibe edici **1κB** proteinleri ile bağlıdır (**Şekil 16.40**). TNF'nin ve Toll-benzeri reseptörlerin aktivasyonu, 1κB'yi fosforilleyen 1κB kinazı aktifleştiren adaptör proteinlerin toplanmasına neden olur. Bu fosforillenme 1κB'yi übikütinlenmeye ve proteazom tarafından yıkıma uğratarak NF-κB'yi nükleusa geçmesi ve hedef genlerin ekspresyonunu uyarması için serbest bırakır.

Hedgehog, Wnt ve Notch yolakları

Hedgehog ve **Wnt** yolakları, transkripsiyon faktörlerini übikütinlenmelerini ve yıkıma uğramalarını inhibe ederek aktive eden yakından ilişkili iki sinyal iletim yolağıdır. Hedgehog ve Wnt yolaklarının her ikisi de ilk olarak *Drosophila*'da tanımlanmıştır, fakat Hedgehog ve Wnt ailelerinin üyeleri, hem omurgalı hem de omurgasız embriyolarının gelişimi sırasında çok geniş olayları kontrol eder. Bu sinyal ileti yolakları tarafından düzenlenen süreçlerin örnekleri, hücre tiplerinin belirlenmesini ve uzuvların, sinir sisteminin, iskeletin, akciğerlerin, saçın, dişlerin ve gonadların gelişimi sırasındaki hücre şablonunun yapılanmasını içerir (Bkz. Bölüm 18).

Hedgehog genleri (birisi *Drosophila*'da ve üçü memelilerde), lipidlerin eklenmesi ile modifiye edilen ve bitişik hücreler üzerinde etkili olan salgılanan



Şekil 16.41 Hedgehog sinyal iletimi (A) Hedgehog olmadığında, Hedgehog reseptörü(Patched) Smothened'ı baskılar ve Ci/Gli transkripsiyon faktörleri protein kinaz A (PKA), casein kinaz-1 (CK1) ve glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) tarafından fosforillenir. Fosforillenmiş Ci/Gli proteinleri übikütinlenir ve reseptör olarak işlev gören parçalara ayrılır. (B) Hedgehog bağlanması Patched'ı engelleyerek Smoothened'un aktivasyonunu sağlar. Bu Ci/Gli proteinlerinin fosforillenmesi ve kesilmesini engeller. Ci/Gli proteinleri daha sonra nükleusa geçer ve hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive eder.

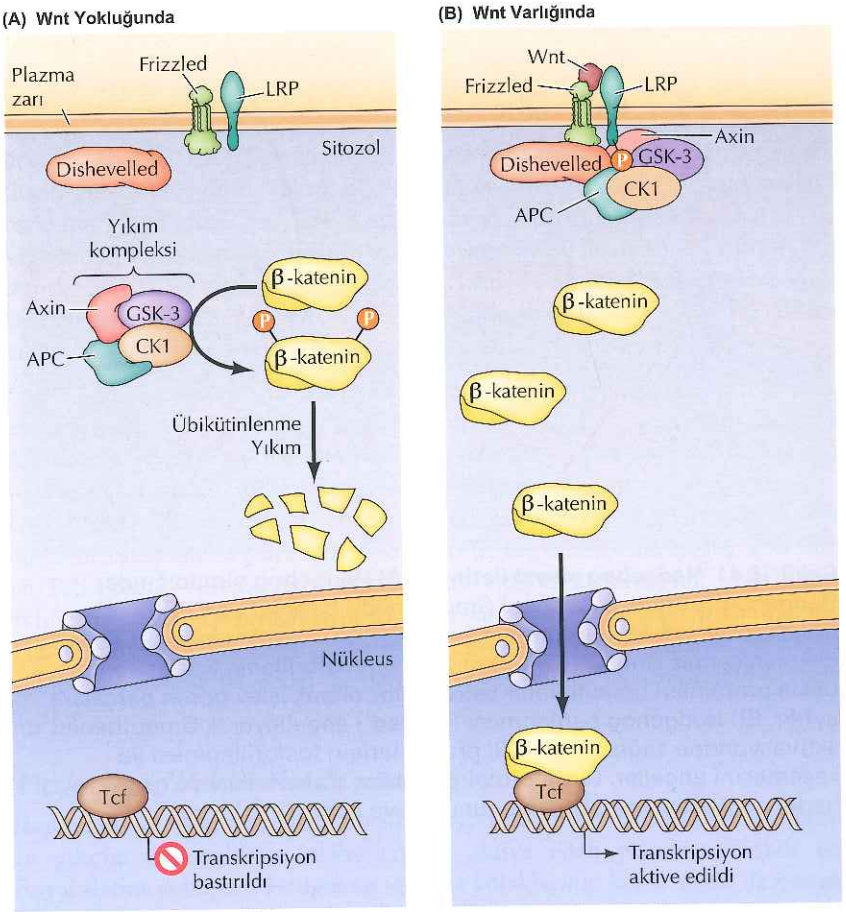
bir proteini kodlar. Hedgehog için reseptör, bir transmembran protein (Patched = Yamalı) olup ikinci bir transmembran proteini (Smoothened=Düzeltilmiş) inhibe eder (Şekil 16.41). Hedgehog'un Patched'e bağlanması onu inhibe ederek Smoothened'ın aktivasyonuna ve sonrasında *Drosophila*'da Ci memelilerde ise Gli olarak adlandırılan bir transkripsiyon faktörünün aktivasyonuna neden olan bir sinyal iletim yolağını başlatır. Smoothened sinyal iletimi olmadığında, Ci/Gli proteinleri protein kinaz A, kasein kinaz-1 ve GSK-3'ü içeren bir dizi protein kinaz tarafından fosforillenir. Bu fosforillenme Ci/Gli

Bilgi İçin

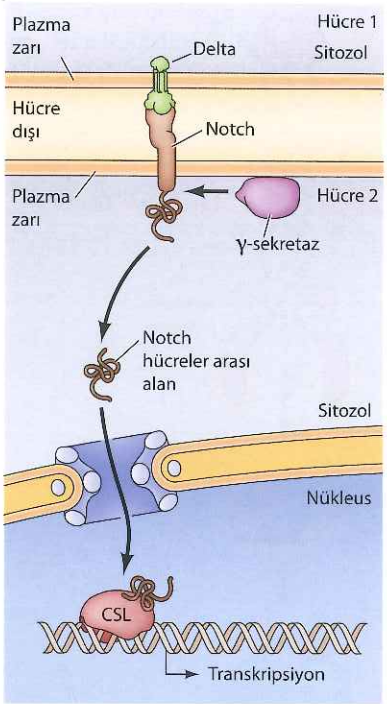
Hedgehog ilk kez *Drosophila*'da tanımlanmış ve adını mutant embriyolardaki kirpi dikenlerine benzeyen kıl benzeri yapılardan almıştır.

proteinlerinin übikitinlenmesine ve böylece represörler olarak davranacakları parçalara ayrılmasına yol açar. Smoothened sinyal iletimi Ci/Gli proteinlerinin fosforillenmesini ve sonrasındaki bölünmesini engelleyerek transkripsiyonel aktivatörleri olarak işlev görmelerine izin verir. Ancak Smoothened'ın aşağı yönündeki moleküler olaylar tam olarak anlaşılamamıştır ve *Drosophila* ile memelilerde farklı olabilir. Bu önemli sinyal iletim yolağından öğrenilecek daha çok şey bulunmaktadır.

Wnt proteinleri, Frizzled ve LRP ailesindeki reseptörlerin kompleksine bağlanan bir salgılanan büyüme faktörleri ailesidir (**Şekil 16.42**). Frizzled ve LRP'den sinyal iletimi, Bölüm 15'te adherens bağlantılarda kadherinleri aktine bağlayan bir transsmembron protein olarak anlatılan β-kateninin stabilizasyonuna neden olur (Bkz. Şekil 15.25). Ancak, kadherinleri aktine bağlaması β-kateninin



Şekil 16.42 Wnt yolağı (A) Wnt olmadığında, β-katenin kasein kinaz-1, aksin ve APC ile kompleks halinde olan GSK-3 (yıkım kompleksi içinde) tarafından fosforillenir ve β-kateninin übikitinlenerek yıkımına neden olur. (B) Wnt polipeptidleri Frizzled ve LRP reseptörlerine bağlanarak Dishevelled'ın göreve gelerek yıkım kompleksinin inaktif ve β-kateninin kararlı hale gelmesine neden olur. β-katenin daha sonra nükleusa geçer ve Tcf transkripsiyon faktörleri ile kompleks oluşturarak represörleri hedef genlerin aktivatörlerine dönüştürür.



Şekil 16.43 Notch sinyal iletimi Notch, komşu hücrelerin üzerindeki transmembran proteinler (örn., Delta) ile direkt hücre-hücre sinyal iletimi için, reseptör olarak görev yapar. Deltanın bağlanması Notch'un γ-sekretaz ile proteolitik kesimine yol açar, Notch'un hücre içi bölgesi salınır ve çekirdeğe geçer, CSL transkripsiyon faktörü ile etkileşime girerek gen ekspresyonunu uyarır.

rollerinden yalnızca bir tanesidir. Wnt sinyal iletiminde, β-katenin bir transkripsiyonel aktivatör olarak davranarak gen ekspresyonunu doğrudan düzenler. Wnt sinyal iletimi olmadığında, β-katenin kasein kinaz-1, aksin ve APC proteinleri ile kompleks (yıkım kompleksi olarak adlandırılır) halinde olan GSK-3 tarafından fosforillenir. Ci/Gli proteinlerinin fosforillenmesi gibi, β-kateninin fosforillenmesi de übikütinlenmesine ve yıkıma uğramasına neden olur. Wnt'in bağlanması Dishevelled (sitoplazmik bir protein) ile Frizzled'ın birleşerek yıkım kompleksini dağıtmasına ve GSK-3'ü inhibe etmesine neden olur. Bunun sonucunda yıkımı engellenen β-katenin nükleusa geçerek Tcf transkripsiyon faktörü ailesi ile kompleks oluşturur. β-katenin olmadığında, Tcf faktörleri represör olarak rol oynar. β-katenin bağlanması Tcf ailesi üyelerini aktivatörlere dönüştürerek hücre kaderini kontrol eden diğer hücre sinyal iletimi molekülleri ve birçok transkripsiyon faktörünün ekspresyonuna yol açar.

Notch yolağı hayvan gelişimi sırasında hücre kadherini kontrol eden, bir diğer yüksek derecede korunmuş sinyal iletim yolağıdır. Notch sinyal iletimi gelişim sırasında doğrudan hücre-hücre temasına bir örnektir. Notch, komşu hücrelerin yüzeyinde yerleşmiş transmembran proteinler (örn., Delta) ile sinyal iletiminde bir reseptör olarak işlev gören ve tek bir transmembran bölgesi olan büyük bir proteindir (**Şekil 16.43**). Notch uyarımı, yeni ve direkt bir transkripsiyonel aktivasyon yolağını başlatır. Özellikle ligand bağlanması, Notch'un γ-sekretaz tarafından proteolitik kesimine neden olur ve böylece Notch'un hücre içi bölümü çekirdeğe geçer. Notch'un hücre içi bölümü daha sonra bir transkripsiyon faktörü (memelilerde CSL denilen) ile bağlanır ve onu hedef genleri için bir represörden bir aktivatöre dönüştürür. Wnt sinyal iletim yolağında olduğu gibi, Notch hedef genleri de hücre kaderini belirleyecek diğer transkripsiyonel düzenleyici molekülleri kodlayan genleri içerir.

Sinyal İletimi Dinamikleri ve Ağları

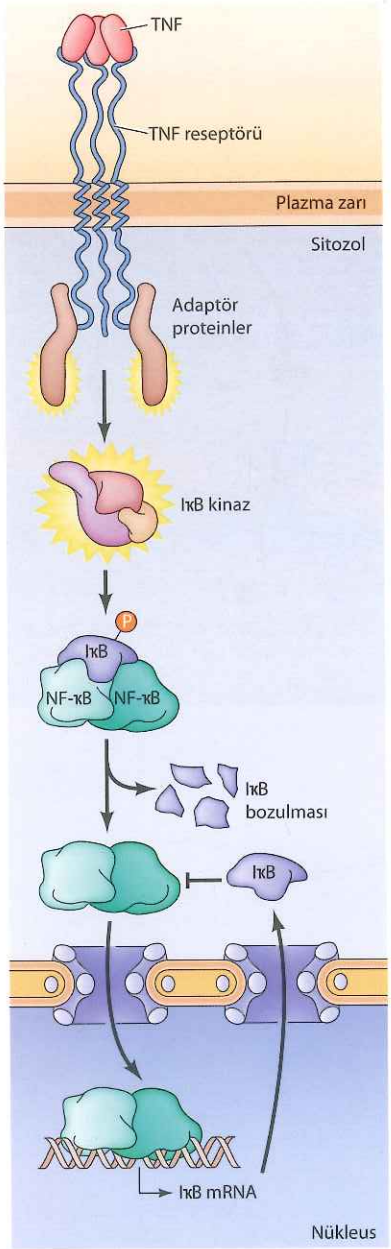
Buraya dek sinyal iletimini, bilgiyi çevreden hücre içi hedeflere ileten lineer yolaklar bakımından tartıştık. Ancak hücre içinde sinyal iletimi bundan çok daha karmaşıktır. Öncelikle, bireysel yolakların aktiviteleri, sinyal iletiminin büyüklüğünü ve süresini kontrol eden geri besleme döngüleri ile düzenlenir. Ayrıca sinyal iletim yolakları izole olarak işlemez, bunun yerine farklı yolaklar arasında sıklıkla çapraz iletişim vardır ve bu hücre içi sinyal iletimin sonuç olarak birleşik yolakların bütünleşik ağları olarak algılanması gerektirir. Bölüm 5'te de anlatıldığı gibi; bu tür sinyal ağlarının dinamik davranışının sayısal modellemesi, sistemler biyolojisindeki güncel araştırmaların bir odak noktasıdır (Bkz. Şekil 5.20).

Geri besleme döngüleri ve sinyal iletimi dinamikleri

Sinyal iletim yolaklarının aktiviteleri **geri besleme döngüleri** tarafından kontrol edilir. Bu döngüler ilkesel olarak metabolik yolakların geri besleme

Bilgi İçin

Notch sinyal iletimindeki rolüne ek olarak γ-sekretaz amiloid öncü proteininin, Alzheimer hastalığının gelişmesine neden olan amiloid-β proteinine (Aβ) kesilmesinden sorumludur (bkz. Bölüm 9 Moleküler Tıp).



Şekil 16.44 NF-κB'nin geri besleme bildirim ile baskılanması NF-κB IκB'nin fosforillenmesi ve yıkımı ile aktive edilir (Bkz. Şekil 16.40). Bu NF-κB'nin nükleusa geçmesine ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmesine neden olur. NF-κB tarafından aktive edilen bu genlerden biri IκB'yi kodlar ve bu da bir geri beslemedöngüsü yaratarak NF-κB tarafından aktivitesini baskılar.

ile düzenlenmesine benzer (Bkz. Şekil 9.39). Negatif geribildirim döngüsünün iyi bir örneği NF-κB yolağında görülmektedir (**Şekil 16.44**). NF-κB IκB inhibitörünün proteolizine yol açan sinyaller ile aktive edilerek NF-κB'nin nükleusa geçmesine ve hedef genlerin ekspresyonunu uyarmasına izin verir. NF-κB ile uyarılan hedef genlerden biri IκB'yi kodlar ve böylece NF-κB sinyal iletimi yeni IκB sentezine yol açarak devam eden NF-κB aktivitesini engeller. Bu düzenleme önemlidir çünkü NF-κB aktivitesinin büyüklüğü ve süresi hücrenin transkripsiyonel yanıtını belirleyebilir. Örneğin, bazı hedef genler 30 ila 60 dakika arasında süren geçici NF-κB aktivitesi ile indüklenirken diğer genlerin indüksiyonu birkaç saat devamlı NF-κB aktivitesi gerektirir.

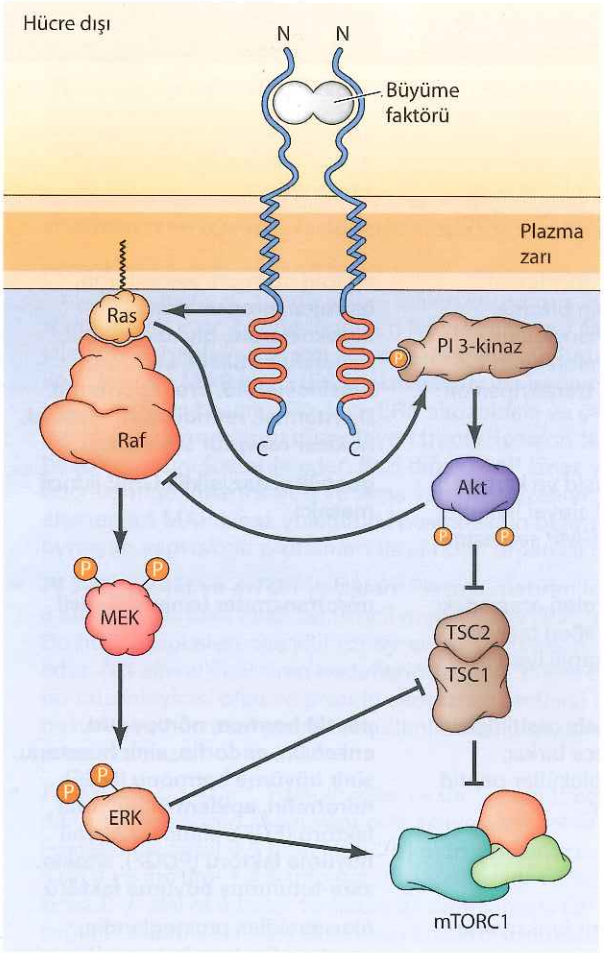
ERK MAP kinaz sinyal iletimi, sinyal iletiminin süresinin önemi açısından bir başka örnek sağlar. İyi çalışılmış bir model olan sinir hücresi büyüme hormonuna (NGF) yanıt olarak hücre farklılaşması modelinde, ERK sinyal iletimi ERK aktivitesinin süresine göre hücre çoğalmasına ya da nöronal diferansiyasyona yol açabilir. Özellikle de ERK'in geçici aktivasyonu (30 ile 60 dakika arasında) hücre çoğalmasını uyarır ancak 2 ile 3 saat boyunca devamlı ERK aktivasyonu NGF ile muamele edilmiş hücrelerin nöronlara farklılaşmasını uyarır. ERK aktivasyon süresindeki bu farklılıkların bu tür farklı biyolojik sonuçlara hangi mekanizma ile neden olduğu anlaşılamamış olmakla birlikte, sinyal iletim aktivitesinin niceliksel faktörlerinin hücre yanıtını oluşturmada önemli olduğu açıktır.

Ağlar ve çapraz iletişim

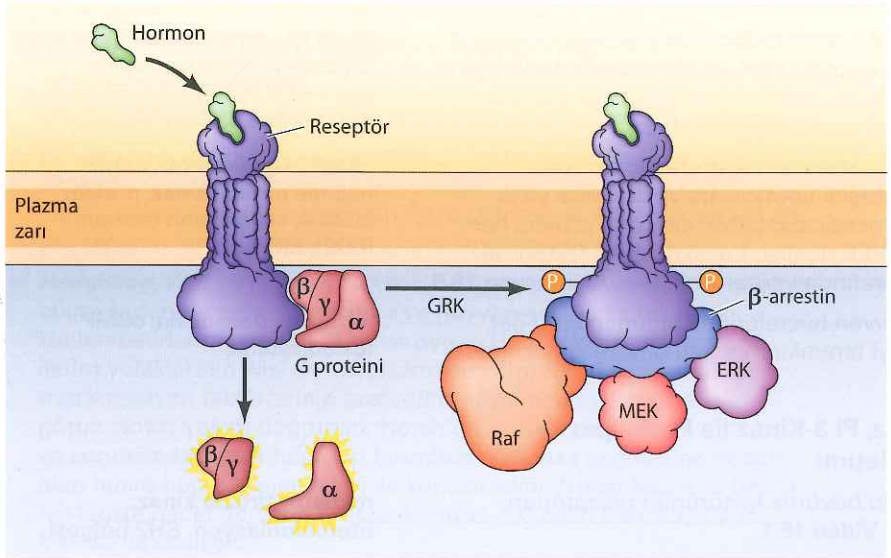
Çapraz iletişim bir sinyal iletim yolağının bir diğeriyle etkileşimi yoluyla hücre içinde farklı yolakların aktivitelerinin bütünleşmesi anlamına gelmektedir. Örneğin, PI 3-kinaz/Akt/mTORCl ve Ras/Raf/MEK/ERK yolakları arasında yoğun çapraz iletişim gerçekleşir (**Şekil 16.45**) Bu iki sinyal iletim yolağı tirozin kinaz reseptörlerinin aşağı yönünde aktive edilir ve hücre çoğalmasında ve sağkalımında önemli roller oynar. Aralarındaki çapraz iletişim, düzenlenmenin hem pozitif hem de negatif noktalarını içerir ve hücre içinde aktivitelerini koordine etmeye yarar.

Sinyal iletiminin süresinin düzenlenmesi ile çapraz iletişimi birleştiği ilginç bir örnek G proteini-eşlikli reseptörlerin çalışmalarından gelir. Bu reseptörler MAP kinaz sinyal iletimine, ilk kez G proteini-eşlikli reseptörlerden G proteinlerine sinyal iletimini kesen düzenleyici proteinler olarak tanımlanmış olan β-arrestin ile bağlıdır (**Şekil 16.46**). Bu reseptörlerin sinyal iletim aktivitesi, GRK'ler (G proteini-eşlikli reseptör kinazlar) olarak adlandırılan bir protein kinaz ailesinin, β-arrestinin fosforillenmiş reseptör ile birleşimini takiben fosforillenmesinin sonucunda kesilmektedir. Bununla birlikte, β-arrestinler G proteinlerinin sinyal iletimini kesmekten fazlasını yapar: Bunlar ayrıca aşağı yönde, reseptör olmayan tirozin kinazlar (örn., Src ailesi üyeleri) ve MAP kinaz yolakları gibi ek yolakları uyararak kendileri sinyal molekülleri gibi rol oynar. Özelikle de, β-arrestin, Raf-MEK-ERK sinyal iletimi için yapı iskelesi proteini olarak görev alarak MAP kinaz aktivitesini G protein eşlikli reseptörlere doğrudan bağlar.

Bireysel sinyal iletimi yolakları arasındaki yoğun çapraz iletişim, hücre içinde çok sayıda yolağın birbirleriyle etkileşerek **sinyal iletim ağları** oluşturduğu anlamına gelir. Dolayısıyla, hücre sinyal iletiminin tam olarak anlaşılabilmesi, bireysel yolakların analizinin ötesine geçerek nihai olarak biyolojik bir yanıt oluşturacak olan birbirine bağlı sinyal iletim yolaklarının davranışını öngören ağ modellerinin geliştirilmesine varabilmelidir.



Şekil 16.45 ERK ve PI 3-kinaz sinyal iletim yolakları arasında çapraz iletişim Ras/Raf/MEK/ERK ve PI 3-kinaz/Akt/mTORC1 yolakları hem pozitif hem de negatif çapraz iletişim ile bağlıdır. Bu iletişim PI 3-kinazın Ras ile aktivasyonunu, Raf'ın Akt ile baskılanmasını, TSC1/2'nin ERK ile baskılanmasını ve mTORC1'in ERK ile aktivasyonunu içerir.



Şekil 16.46 G proteini-eşlikli reseptörler ile *β*-arrestin yoluyla ERK sinyal iletimi arasında çapraz iletişim Ligand bağlanması G proteini-eşlikli reseptörleri uyararak G proteininin aktivasyonuna yol açar. Reseptörlerin aktivitesi GRK'lerin fosforilasyonu ve *β*-arrestinin fosforillenmiş reseptör ile birleşmesi sonucu kesilir. *β*-arrestin ayrıca Raf, MEK, ERK için iskele proteini olarak rol oynayarak G protein-eşlikli reseptörleri ERK sinyal iletim yolağına bağlar.

ÖZET

Sinyal İletimi Molekülleri ve Reseptörleri

- ***Hücre-hücre sinyal iletimi tipleri:*** Çoğu sinyal iletimi molekülleri bir hücreden salınırlar ve hedef hücreleri tarafından eksprese edilen reseptörlerine bağlanırlar. Hücre-hücre sinyal iletimi, sinyalin katedeceği mesafe temel alınarak üç genel kategoride (endokrin, parakrin ve otokrin sinyal iletimi) incelenir.
- ***Steroid hormonlar ve nükleer reseptör süperailesi:*** Steroid hormonlar, tiroid hormon, D_3 vitamini ve retinoik asit, hedef hücrelerinin plazma zarından difüze olan ve hücre içindeki reseptörlerine bağlanan, küçük, hidrofobik moleküllerdir. Nükleer reseptörler süperailesi üyeleri ligand bağlanmasına yanıt olarak gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleri olarak fonksiyon görürler. Bkz. **Animasyon 16.1.**
- ***Nitrik oksid ve karbonmonoksid:*** Basit bir gaz olan nitrik oksid ve karbon monoksid sinir sisteminde ve diğer hücre tiplerinde önemli sinyal iletimi molekülleridir. Bu gazlar guanilil siklazı aktive ederek siklik GMP sentezine yol açar.
- ***Nörotransmiterler:*** Sinirsel ileticiler sinaps yapan sinir hücreleri arasındaki veya sinir hücreleri ile diğer hedef hücreleri arasındaki sinyalleri taşıyan küçük hidrofobik moleküllerdir. Çoğu sinirsel iletici ligand-kapılı iyon kanallarına bağlanır.
- ***Peptid hormonlar ve büyüme faktörleri:*** Hayvanlarda en geniş çeşitliliğe sahip sinyal iletimi molekülleri peptidlerdir, boyutları yalnızca birkaç aminoasitten 100 amino asite kadar değişebilir. Bu grup moleküller peptid hormonları, nörotransmiterleri ve büyüme faktörlerini içerir.
- ***Ökosanoidler:*** Ökosanoidler parakrin ve otokrin sinyal iletimi fonksiyonu gören bir grup lipiddir.
- ***Bitki hormonları:*** Bitki hormonu olarak bilinen küçük moleküller bitki büyümesini ve gelişimini düzenlerler.

G Proteinleri ve Siklik AMP Sinyal İletimi

- ***G proteinleri ve G proteini-eşlikli reseptörler:*** Hücre yüzey reseptörlerinin çoğu hormon reseptörlerini ve nörotransmiterleri için reseptörleri içeren büyük bir ailesi, sinyalleri hücre içi hedeflere G proteinleri aracılığı ile iletirler. Bkz. **Animasyon 16.2.**
- ***cAMP yolağı : İkincil mesajcılar ve protein fosforilasyonu:*** Siklik AMP, hayvan hücrelerinin çok çeşitli hormonlara ve kokulara yanıt vermesinde önemli bir ikincil mesajcıdır. cAMP nin çoğu etkileri, hem metabolik enzimleri hem de CREB denilen transkripsiyon faktörünü fosforilleyen protein kinaz A tarafından düzenlenir. Bkz. **Animasyon 16.3.**
- ***Siklik GMP:*** Siklik GMP de hayvan hücrelerinde bulunan bir diğer önemli ikincil mesajcıdır. En iyi tanımlanmış rolü omurgalı gözündeki görsel algılamadadır.

Tirozin Kinazlar ve MAP Kinaz, PI 3-Kinaz ile Fosfolipaz C/ Kalsiyum Yolakları ile Sinyal İletimi

- ***Reseptör tirozin kinazlar:*** Çoğu büyüme faktörünün reseptörleri, protein-tirozin kinazlardır. Bkz **Video 16.1.**

ANAHTAR SÖZCÜKLER

endokrin sinyal iletimi, hormon, parakrin sinyal iletimi, otokrin sinyal iletimi

steroid hormon, testosteron, östrojen, progesteron, kortikosteroid, glukokortikoid, mineralokortikoid, ekdizon, brasinosteroid, tiroid hormonu, D_3 vitamini, retinoik asit, retinoid, nükleer reseptör süperailesi

guanilil siklaz, siklik GMP, ikincil mesajcı

nörotransmiter (sinirsel iletici)

peptid hormon, nöropeptid, enkefalin, endorfin, sinir hormonu, sinir büyüme hormonu (NGF), nörotrofin, epidermal büyüme faktörü (EGF), platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF), sitokin, zara-tutunmuş büyüme faktörü

ökosanoidler, prostoglandin, prostasiklin, tromboksan, lökotrien

bitki hormonu, gibberelin, oksin, etilen, sitokinin, absisik asit

hücre içi sinyal iletimi, G proteini, G proteini-eşlikli reseptörler, siklik AMP (cAMP), adenilil siklaz, heterotrimerik G proteinleri

cAMP fosfodiesteraz, cAMP-bağımlı protein kinaz, protein kinaz A, cAMP yanıt elemanı (CRE), CREB

rodopsin, transdüsin, cGMP fosfodiesteraz

reseptör tirozin kinaz, otofosforilasyon, SH2 bölgesi

ÖZET

- ***Reseptör olmayan tirozin kinazlar:*** Çoğu reseptörler reseptör olmayan protein-tirozin kinazlar ile bağlanarak etki gösterir. Sitokin reseptörleri, STAT transkripsiyon faktörlerini fosforiller ve aktive eden JAK ailesi tirozin kinazları ile ilişkilidir. Src ailesinin reseptör olmayan tirozin kinazları, integrinler ve diğer adhezyon molekülleri gibi, çeşitli sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin aşağı yönünde işlev görür.

- ***MAP kinaz yolakları:*** MAP kinaz yolağı çok sayıda ekstraselüler sinyallerin aşağı yönünde aktive edilen korunmuş bir protein kinazlar zinciridir. Hayvan hücrelerinde en iyi tanımlanmış MAP kinaz tipleri küçük GTP-bağlayan protein Ras aracılığıyla büyüme faktörü reseptörleri ile eşleşir ve MAP kinaz (ERK) aktivasyonuna neden olan bir protein kinaz yolağını başlatır. Böylece ERK sitozoldeki ve çekirdekteki acil erken gen uyarımlarını düzenleyen transkripsiyon faktörlerini de içeren birçok proteini fosforile eder. Bazı diğer MAP kinaz yolakları memeli hücrelerinde inflamasyon ve stres yanıtını düzenler. MAP kinaz yolağının elemanları MAP kinaz yolağının spesifitesinin belirlenmesinde önemli rol oynayan yapı iskele proteinleri tarafından organize edilir.

- ***PI 3-kinaz/Akt ve mTOR yolakları:*** Plazma mebran fosfolipidi PIP_2, PI 3-kinaz tarafından farklı bir ikincil mesajcı olan PIP_3'e fosforillenebilir. Bu hücre sağkalımında kilit rol oynayan serin/treonin kinaz Akt'yi aktive eder. Akt sinyal iletiminin hedeflerinden biri, hücre büyümesinin merkezi bir düzenleyicisi olan ve protein sentezi ile otofajiyi büyüme faktörü, besinler ve hücresel enerjinin kullanılabilirliğine göre eşleyen mTOR protein kinazdır.

- ***Fosfolipaz C ve Ca^{2+}:*** Fosfolipidler ve Ca^{2+}, hem tirozin kinazların hem de G proteinlerinin aşağı yönünde aktive olan genel ikinci mesajcılardır. Fosfatidil inozitol 4,5-bifosfat (PIP_2) hidrolizi sonucunda diasilgliserol (DAG) ve inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) elde edilir ve bunlar sırasıyla protein kinaz C yi aktive ederler ve hücre içi depolardaki Ca^{2+}'un hareketini sağlar. Sitozolik Ca^{2+}'un düzeyinin artması sonucunda Ca^{2+}/kalmodulin-bağımlı protein kinazları da içeren çok sayıda hedef protein aktive olur. Sinir ve kas hücreleri gibi elektriksel uyarılara yanıt verebilen hücrelerde plazma zarındaki voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının ve endoplazmik retikulum ya da sarkoplazmik retikulumdaki riyanodin reseptörlerinin açılması ile sitozoldeki Ca^{2+} düzeyi artar.

Transkripsiyon Faktörleri ile Eşlenik Reseptörler

- ***TGF-β/Smad yolağı:*** TGF-β reseptör ailesi üyeleri serin/treonin kinazlar olup Smad transkripsiyon faktörlerini doğrudan fosforilleyip aktive eder.

- ***NF-κB sinyal iletimi:*** NF-κB transkripsiyon faktörü ailesi üyeleri sitokinlere, büyüme faktörlerine ve diğer uyarı çeşitlerine yanıt olarak aktive olur. Aktivasyonları fosforillenme ve inhibe eden IκB alt birimlerinin fosforillenmesi ve yıkımı ile gerçekleşir.

- ***Hedgehog, Wnt ve Notch yolakları:*** Hedgehog, Wnt ve Notch yolakları hücre kaderinin belirlenmesinde ve hayvan gelişimi sırasındaki kalıbın belirlenmesinde kilit roller oynar. Hedgehog ve Wnt sinyal iletim yolaklarının ikisi de sitoplazmada komplekler içinde bulunan transkripsiyon faktörlerinin proteolitik yıkımını engelleyerek işlev görür. Notch yolağı doğrudan, Notch'un proteolitik yıkımını uyaran ve sonrasında Notch hücre içi biriminin nükleusa geçmesine neden olan hücre-hücre etkileşimleri ile kontrol edilir. Notch hücre içi birimi nükleusta hedef genlerin ekspresyonuna etki eden transkripsiyon faktörü ile etkileşir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

reseptör olmayan tirozin kinaz, sitokin reseptör süperailesi, janus kinaz (JAK), STAT protein, Src, FAK

MAP kinaz, ERK, Ras, guanin nükleotid değişim faktörü (GEF), GTPaz-aktive edici protein (GAP), Raf, MEK (MAP kinaz/ERK kinaz), acil-erken gen, serum yanıt elemanı (SRE), serum yanıt faktörü (SRF), Elk-1, yapı iskele proteini

fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP_2), fosfatidilinozit (PI), 3-kinaz, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP_3), Akt, mTOR

fosfolipaz C, diasilgliserol (DAG), inositol 1,4,5-trifosfat (IP3), protein kinaz C, kalmodulin, CaM kinaz, riyanodin reseptörü

transforme edici büyüme faktörü (TGF-β), Smad

NF-κB, tümor nekroz faktörü, Toll-benzeri reseptör, IκB

Hedgehog, Wnt, Notch

ÖZET

Sinyal İletim Dinamikleri ve Ağları

- ***Geri besleme döngüleri ve sinyal iletim dinamikleri:*** Hücrede sinyal iletim yolaklarının aktivitesi, sinyal iletiminin büyüklüğünü ve süresini kontrol eden geri besleme döngüleri ile düzenlenir. Aktivitedeki niceliksel farklılıklar, sinyal iletim yolaklarındaki biyolojik sonuç için önemli olabilir.

geri besleme döngüsü

- ***Ağlar ve çapraz iletişim:*** Farklı sinyal iletim yolakları çapraz iletişim ile birbirlerinin aktivitesini düzenlemek için etkileşir. Bireysel yolaklar arasında yoğun çapraz iletişim karmaşık sinyal iletim ağlarının oluşmasına neden olur. Hücrede sinyal iletiminin tam olarak anlaşılması niceliksel ağ modellerinin geliştirilmesini gerektirecektir.

çapraz iletişim, sinyal iletim ağı

ANAHTAR SÖZCÜKLER

Atıf

Hücre
Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Sorular

1. Parakrin sinyal iletimi ile endokrin sinyal iletiminin farkı nedir?
2. Steroid hormonlar gibi hidrofobik sinyal iletimi molekülleri ile, peptid hormonlar ile sinyal iletimi arasında nasıl bir fark vardır?
3. Aspirinin inflamasyonu ve kan pıhtılaşmasını azaltıcı etkisi nasıl gerçekleşir?
4. Tiroid hücrelerinin proliferasyonu G_s ile eşleşen bir reseptörü aktive eden hormonlar ile uyarılır. cAMP fosfodiesteraz inhibitörleri bu hücrelerin proliferasyonunu nasıl etkiler?
5. Epinefrin reseptörü G_s ile eşleşir, buna karşın asetilkolin reseptörü (kalp kası hücrelerindeki) G_i ile eşleşir. Epinefrin reseptörünün ekstraselüler dizisini, asetilkolin reseptörünün sitozoldeki dizisi ile birleştirerek rekombinant bir molekül yapacağınızı varsayalım. Bu rekombinant molekülü eksprese eden hücrelerde epinefrinin cAMP düzeyi üzerine etkisi ne olabilir? Asetilkolinin etkisinin ne olmasını beklersiniz?
6. Protein fosfataz 1 overekspresyonu, uygun hedef hücrelerin hormon stimülasyonuna yanıt olarak cAMP-ile uyarılabilir genlerin uyarılmasını nasıl etkileyecektir? Protein fosfataz 1 cAMP-kapılı iyon kanallarının fonksiyonunu nasıl etkileyecektir?
7. Platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF) iki polipetid zincirinden oluşan bir dimerdir. PDGF reseptör sinyal iletiminde, PDGF monomerinin etkisinin ne olacağını düşünürsünüz?
8. EGF reseptörünün tirozin kinaz bölgesi eksik olan kesilmiş bir versiyonunu oluşturdunuz. Bu kesilmiş reseptörün ekspresyonu hücrelerin EGF'ye yanıtını inhibe ediyor. Neden?
9. STAT ailesinin spesifik bir üyesi belirli karaciğer genlerinin sitokin uyarımına yanıtını indüklüyor. JAK'ın dominant-negatif bir mutantını yüksek düzeyde eksprese etseydiniz, bu genlerin indüksiyonu nasıl etkilenirdi?
10. Fibroblatlarda büyüme faktörü muamelesine yanıt olarak Ras/Raf/MEK/ERK yolağı ile indüklenen acil-erken bir gen üzerinde çalışıyorsunuz. Ras guanin nükleotid değişim faktörüne karşı siRNA ekspresyonu bu genin indüklenmesini nasıl etkiler?
11. PI 3-kinaz/Akt yolağı büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak hücresel protein sentezini nasıl etkiler?

12. Wnt sinyal iletim yolağı tarafından indüklenen bir gen üzerinde çalışıyorsunuz. β-kateninin oynadığı rolü belirlemek için farklı bölge-spesifik β-katenin mutantları yaratıyorsunuz. Bir spesifik lizin kalıntısının (Lys) arjinin (Arg) ile değişimi β-kateninin nükleer birikimine ve genin devamlı olarak ekspresyonuna (Wnt stimulasyonu olmadan da) neden oluyor. Bu mutasyonun β-katenin aktivitesini değiştirmesi için en olası mekanizması nedir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

(Her ana bölüm için en önemli derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Sinyal İletimi Molekülleri ve Reseptörleri

Andrea, J., R. Gallini and C. Betsholtz. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 22: 1276-1312. [R]

Arai, K., F. Lee, A. Miyajima, S. Miyatake, N. Arai and T. Yokota. 1990. Cytokines : Coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 783-836. [R]

Calabrese, V., C. Mancuso, M . Calvani, E. Rizzarelli, D. A. Butterfield and A.M. G. Stella. 2007. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Rev. Neurosci.* 8: 766-775. [R]

Cao, Y. 2013. Multifarious function of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis. *Trends Mol. Med.* 19: 460--473. [R]

Cohen, P. 2006. The twentieth century struggle to decipher insulin signaling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 867-873. [R]

Cohen, S. 2008. Origins of growth factors: NGF and EGF. *J. Biol. Chem.* 283: 33793-33797. [R]

Cunningham, T. J. and G. Duester. 2015. Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 110-123. [R]

Hess, D. T., A. Matsumoto, S.-O. Kim, H. E. Marshall and J. S. Stamler. 2005. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 150-166. [R]

Hetherington, A.M . and L. Bardwell. 2011. Plant signaling pathways: a comparative evolutionary overview. *Curr. Biol.* 21: R317-R319. [R]

Hill, B. G., B. P. Dranka, S.M. Bailey, J. R. Lancaster Jr. and V. M. Darley-Usmar. 2010. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J. Biol. Chem.1 285:* 19699-19704. [R]

Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237: 1154-1162. [R]

Li, L. and P. K. Moore. 2007. An overview of the biological significance of endogenous gases: new roles for old molecules. *Biochem. Soc. Tran.* 35: 1138-1141. [R]

McDonnell, D. P. and J. D. Norris. 2002. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 296: 1642- 1644. [R]

Nagy, L. and J. W. R. Schwabe. 2004. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem.* Sci. 29: 317-324. [R]

Ornitz, D. M. and P. J. Marie. 2015. Fibro blast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev.* 29: 1463-1486. [R]

Santner, A. and M. Estelle. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature* 459: 1071-1078. [R]

Sonoda, J., L. Pei and R. M. Evans. 2008. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Let.* 582: 2-9. [R]

Turner, N., and R. Grose. 2010. Fibroblast growth factor signaling: from development to cancer. *Nature Rev. Cancer* 10: 116-129. [R]

Wang, D. and R. N. DuBois . 2010. Eicosanoids and cancer. *Nature Rev. Cancer* 10: 181-193. [R]

G Proteinleri ve Siklik AMP Sinyal İletimi

Audet, M. and M. Bouvier. 2012 . Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell* 151: 14-23. (R]

Conti, M. and J. Beavo. 2007. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodies terases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 481-511. [R]

Hofmann, F. 2005. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J. Biol . Chem.* 280: 1-4. [R]

Hofmann, K. P., P. Scheerer, P. W. Hildebrand, H.-W. Choe, J. H. Park, M. Heck and O. P. Ernst. 2009. A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem. Sci.* 34: 540-552. [R]

Lefkowitz, R. J. 2004. Historical rev iew: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacal. Sci.* 25: 413-422. [R]

Malbon, C. C. 2005. G proteins in development. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 689-701. [R]

Mayr, B. and M. Montminy. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent

factor CREB. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 599-609. [R]

Neves, S. R., P. T. Ram and R. Iyengar. 2002. G protein pathways. *Science* 296: 1636-1639. [R]

Oldham, W. M. and H. E. Hamm. 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 60-71. [R]

Siderovski, D. P. and F. S. Willard. 2005. The GAPs, GEFs, and CDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Inti. J. Biol. Sci.* 1: 51-66. [R]

Taylor, S. S., C. Kim, C. Y. Cheng, S. H. J. Brown, J. Wu and N. Kannan. 2008. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim. Biophys. Acta* 1784: 16-26. [R]

Tirozin Kinazlar ve MAP Kinaz, PI 3-Kinaz ile Fosfolipaz C/Kalsiyum Yolakları ile Sinyal İletimi

Baker, S. J., S. G. Rane and E. P. Reddy. 2007. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene* 26: 6724-6737. [R]

Brazil, D. P., Z.-Z. Yang, and B. A. Hemmings. 2004. Advances in protein kinase B signaling: *AKT*ion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.* 29: 233-242. [R]

Cavallaro, U. and E. Dejana. 2011. Adhesion molecule signaling: not always a sticky business. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 189-197. [R]

Clapham, D. E. 2007. Calcium signaling. *Cell* 131: 1047-1058. [R]

Corcoran, E. E. and A R. Means . 2001. Defining Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 276: 2975-2978. [R]

Efeyan, A., W. C. Comb and D. M. Sabatini. 2015. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* 517: 302-310. [R]

Eijkelenboom, A. and B. M. T. Burgering. 2013. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 83-97. [R]

Good, M. C., J. G. Zalatan and W. A. Lim. 2011. Scaffold proteins: hubs for control ling the flow of cellular information. *Science* 332: 680-686. [R]

Hunter, T. and B. M. Sefton. 1980. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 1311-1315. [P]

Irvine, R. F. 2003. 20 years of Ins(1,4,5) P_3 and 40 years before. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 586-590. [R]

Johnson, G. L. and R. Lapadat. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912. [R]

Jope, R. S. and G. V. W. Johnson. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29: 95-102. [R]

Lemmon, M.A. and J. Schlessinger. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141: 1117-1134. [R]

Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934. [R]

Matallanas, D., M. Birtwistle, D. Romano, A. Zebisch, J. Rauch, A von Kriegsheim and W. Kolch. 2011. Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer* 2: 232-260. [R]

McKay, M. M. and D. K. Morrison. 2007. Integrating signals from RTKs to ERK/ MAPK. *Oncogene* 26: 3113-3121. [R]

Mihaylova, M. M. and R. J . Shaw. 2011. The AMPK signaling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biol.* 13: 1016-1023. [R]

Miranti, C. K . and J. S. Brugge. 2002. Sensing the environment: A historical perspective on integrin signal transduction. *Nature Cell Biol.* 4: E83-E90. [R]

Mitra, S. K. and D. D. Schlaepfer. 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18: 516-523. [R]

Parsons, S. J. and J. T. Parsons. 2004. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23: 7906-7909. [R]

Raman, M., W. Chen and M. H. Cobb. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26: 3100-3112. [R]

Schindler, C., D. E. Levy and T. Decker. 2007. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J. Biol. Chem.* 282: 20059- 20063. [R]

Stepniak, E., G. L. Radice and V. Vasioukhin. 2009. Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1:a002949. [R]

Turjanski, A G., J. P. Vaque and J. S. Gut kind. 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26: 3240- 3253. [R]

Vanhaesebroeck, B., L. Stephens and P. Hawkins. 2012. PI3K signaling: the path to discovery and understanding. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 195-203. [R]

Venkatachalam, K., D. B. van Rossum, R. L. Patterson, H.-T. Ma and D. L. Gill. 2002. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature Cell. Biol.* 4: E263-272. [R]

Zalk, R., S. E. Lahnar t and A. R. Marks. 2007. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 367-385. [R]

Zoncu, R., A Efeyan and D. M. Sabatini. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Mol. Cell Biol.* 12: 21-35. [R]

Transkripsiyon Faktörleri ile Eşlenik Reseptörler

Briscoe, J. and P. P. Therond . 2013. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 416--429. [R]

Clevers, H., K. M. Loh and R. Nusse. 2014. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 346: 1248012. [R]

Gay, N. J. and M. Gangloff. 2007. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 141-165. [R]

Hayden, M. S. and S. Ghosh. 2012. NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions . *Genes Dev.* 26:203-234. [R]

Ng, J. M. Y. and T. Curran. 2011. The Hedge hog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nature Rev. Cancer* 11: 493-501. [R]

Ingham, P. W., Y. Nakano and C. Seger. 2011. Mechanisms and functions of Hedgehog signaling across the metazoa. *Nature Rev. Genet.* 12: 393--406. [R]

Kitisin, K., T. Saha, T. Blake, N. Golestaneh, M. Deng, C. Kim, Y. Tang, K. Shetty, B. Mishra and L. Mishra. 2007. TGF-β signaling in development. *Science STKE* 2007: cm1. [R]

Kopan, R. and M. X. G. Hagan. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137: 216-233. [R]

Massague, J., J. Seoane and D. Wotton. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19:2783-2810. [R]

Niehrs, C. 2012. The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 767-779. [R]

Schmierer, B. and C. S. Hill. 2007. TGFβ- SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 970-982. [R]

Sinyal İletim Dinamikleri ve Ağları

Aldridge, B. B., J. M. Burke, D. A Lauffenburger and P. K. Sorger. 2006. Physico chemical modelling of cell signalling pathways. *Nature Cell Biol.* 8: 1195-1203. [R]

Hoffmann, A , A. Levchenko, M. L. Scott and D. Baltimore. 2002. The IκB – NF-κB signaling module: Temporal control and selective gene activation. *Science* 298: 1241-1245. [P]

Lefkowitz, R. J. and S. K. Shenoy. 2005. Transduction of receptor signals by β- arrestins. *Science* 308: 512-517. [R]

Ma'ayan, A., S. L. Jenkins, S. Neves, A. Hasseldine, E. Grace, B. Dubin-Thaler, N.J. Eungdamrong, G. Weng, P. T. Ram, J. J. Rice, A Kershenbaum, G. A. Stolovitzky, R. D. Blitzer, and R. Iyengar. 2005. Formation of regulatory patterns during signal propagation in a mammalian cellular network. *Science* 309: 1078-1083. [P]

Marshall, C. J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal regulated kinase activation. *Cell* 80: 179-185. [R]

Mendoza, M. C., E. E. Er and J. Blenis. 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* 36: 320-328. [R]

Papin, J. A., T. Hunter, B. O. Palsson and S. Subramaniam. 2005. Reconstruction of cellular signaling networks and analysis of their properties. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 99-111. [R]

Purvis, J. E. and G. Lahav. 2013. Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics. *Cell* 152: 945-956. [R]

Zhu, X., M. Gerstein and M. Snyder. 2007. Getting connected: analysis and principles of biological networks. *Genes Dev.* 21: 1010-1024. [R]

BÖLÜM 17

Hücre Döngüsü

Ökaryot Hücre Döngüsü 651

Hücre Döngüsü İlerlemesinin Düzenleyicileri 657

M Evresi Olayları 670

Mayoz ve Döllenme 679

Anahtar Deney MPF'nin Keşfi 658

Anahtar Deney Siklinlerin Tanımlanması 661

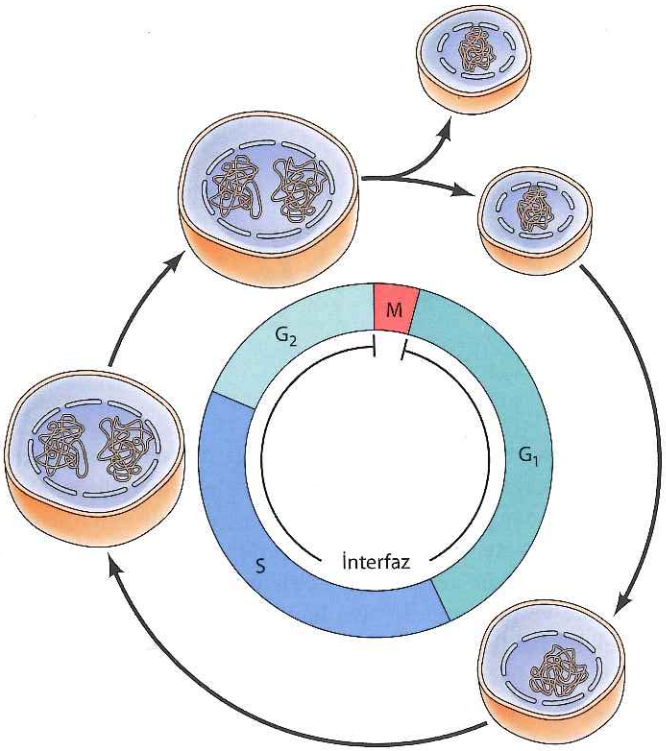
Hücrelerin olasılıkla en temel karakteristik özelliği, tüm canlı organizmalar için söylenebileceği gibi, kendi başlarına üremeleridir. Bütün hücreler, hücre bölünme döngüsünün her tamamlanışında, bir ana hücreden iki yavru hücre oluşturmak üzere ikiye bölünerek ürerler. Yeni oluşan bu yavru hücreler de kendi başlarına büyür ve bölünür, böylelikle tek bir ana hücreden ve yavrularından büyüme ve bölünme ile yeni hücreler oluşur. Bu büyüme ve bölünme döngüleri, tek bir bakterinin, agar besi yerinde bir gecelik inkübasyon süresince, milyonlarca yavru hücre içeren bir koloni oluşturmasını mümkün kılar. Daha karmaşık olarak, tek bir döllenmiş yumurta, tekrarlanan büyüme ve bölünme döngüleri sonucunda, insan vücudunu meydana getirecek 10^{14}'den fazla hücre oluşturur.

Tüm hücrelerde bölünme, yavruların eksiksiz genoma sahip olmasını sağlamak için, hücre büyümesi ve DNA replikasyonu dikkatle denetlenmelidir. Ökaryot hücrelerde hücre döngüsü süreci, mayalardan memelilere kadar korunmuş olan bir seri protein kinaz tarafından kontrol edilir. Yüksek ökaryotlarda hücre döngüsü mekanizması, hücrelerin, çoğalmasını denetleyen büyüme faktörleri tarafından, organizmanın bir bütün olarak gereksinimleri doğrultusunda hücre bölünmesine imkan vererek düzenlenir. Hücre döngüsü regülasyonundaki bozuklukların, kanser hücrelerinin anormal çoğalmasının başlıca nedeni olması şaşırtıcı değildir. Bu yüzden, hücre döngüsü ve kanser çalışmaları, Bölüm 16'da tartışılan, kanser ile hücre sinyal yolaklarının incelenmesi arasındaki ilişkiye benzer şekilde, birbiriyle yakından ilişkilidir.

Ökaryot Hücre Döngüsü

Hücrelerin çoğunda bölünme döngüsü birbiri ile bağlantılı dört süreçten oluşur: Hücre büyümesi, DNA replikasyonu sayıca iki katına çıkan kromozomların yavru hücrelere dağılması ve hücre bölünmesi. Bakterilerde hücre büyümesi ve DNA replikasyonu, hücre döngüsünün büyük bölümünde devam eder ve eşleşmiş kromozomlar yavru hücrelere, plazma zarı ile birlikte dağılır. Ökaryotlarda ise hücre döngüsü, farklı dört evreden oluşur ve daha karmaşıktır. Hücre büyümesi, her ne kadar, genellikle kesintisiz bir süreç ise de, DNA hücre döngüsünün sadece bir evresinde sentezlenir ve daha sonra kopyalanmış kromozomlar hücre bölünmesi öncesi bir dizi karmaşık olayla yavru çekirdeklerine dağıtılır. Hücre döngüsünün bu basamakları, korunmuş bir denetleyici sistem tarafından kontrol edilir. Bu sistem sadece hücre döngüsünün farklı olaylarını düzenlemekle kalmaz, hücre döngüsünün, hücre çoğalmasını kontrol eden ekstraselüler sinyallerle bağlantısını da sağlar.

Video 17.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v17.1
Gerçek Zamanda Mitoz Bölünme Mitoz ve sitokinez, hayvan hücrelerinin mitotik evresini belirlerler.



Şekil 17.1 Hücre döngüsünün evreleri Ökaryot hücrelerin çoğunun bölünme döngüsü dört farklı evreye ayrılır: M, G_1, S ve G_2. M evresini (mitoz) genellikle sitokinez izler. S evresi DNA replikasyonunun gerçekleştiği dönemdir. Hücre, G_1, S ve G_2'yi kapsayan interfaz boyunca büyür. Burada şematize edilmiş olan hücre döngüsü evrelerinin göreli uzunlukları, hızlı çoğalan memeli hücreleri için tipiktir.

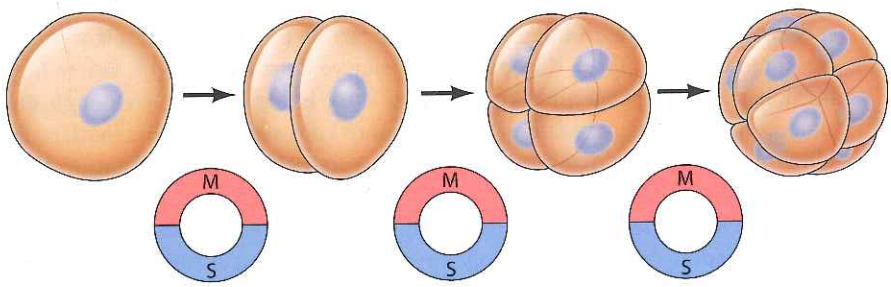
Hücre döngüsünün evreleri

Tipik bir ökaryot hücre döngüsü, kültür ortamında yaklaşık her 24 saatte bir bölünen insan hücreleri ile gösterilmiştir. Mikroskopta gözlendiğinde, hücre döngüsü, **mitoz** ve **interfaz** olarak iki temel bölüme ayrılır. Hücre döngüsünün en etkileyici evresi, yavru kromozomların birbirinden ayrıldığı ve hücre bölünmesi (**sitokinez**) ile sonlanan mitoz (çekirdek bölünmesi) evresidir. Ancak, mitoz ve sitokinez sadece bir saat sürer, hücre döngüsünün %95'i interfazda (mitozlar arası dönem) geçer. İnterfaz sırasında kromozomlar yoğunluğunu kaybeder ve nükleus içine yayılırlar ve nükleus morfolojik olarak homojen görünür. Moleküler düzeyde ise interfaz, hücre büyümesi ve DNA replikasyonunun gerçekleştiği, bölünmeye hazırlık aralığıdır.

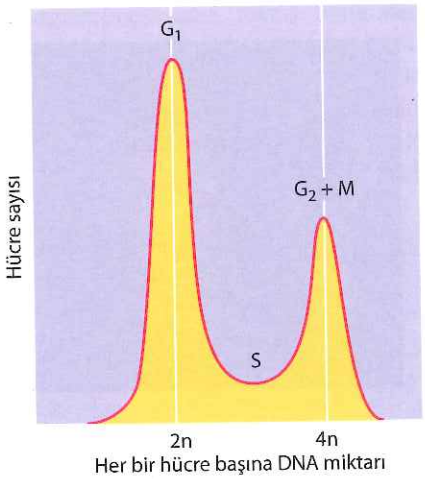
Hücre, interfaz süresince sabit hızda büyür ve bölünen hücrelerin çoğu bir mitozdan diğerine hacim olarak iki katına çıkar. Bunun aksine, DNA interfazın sadece bir bölümünde sentezlenir. DNA sentezinin zamanlaması, ökaryot hücre döngüsünü dört farklı evreye böler (Şekil 17.1). Döngünün **M evresi**, genellikle sitokinez ile devam eden mitozdur. Bu evreyi, mitoz ile DNA replikasyonunun başlaması arasındaki süreci oluşturan **G_1 evresi** (gap 1) izler. Hücre, G_1 boyunca metabolik olarak aktiftir ve DNA'sını kopyalamaksızın sürekli büyür. G_1 evresini, DNA replikasyonunun yer aldığı **S evresi** (sentez) izler. DNA sentezinin tamamlanmasını, hücre büyümesinin devam ettiği ve mitoza hazırlık için proteinlerin sentezlendiği **G_2 evresi** (gap 2) izler.

Animasyon 17.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a17.1
Hücre Döngüsünün Evreleri
Çoğu ökaryotik hücrenin hücre döngüsü dört farklı evreye ayrılmıştır: M, G_1, S, and G_2.

Farklı hücre tiplerinde bu hücre döngüsü evrelerinin süreleri önemli oranda değişir. Toplam döngü süresi 24 saat olan ve hızlı çoğalan tipik bir insan hücresi için, G_1 evresi 11 saat, S evresi 8 saat, G_2 evresi 4 saat ve M 1 saat civarındadır. Diğer hücre tipleri ise çok daha hızlı bölünebilir. Örneğin; tomurcuklanan mayalar, hücre döngüsünü sadece 90 dakikada tamamlar. Hücre döngüleri, yumurta döllenmesinin hemen ardından erken embriyo hücrelerinde daha da kısadır (30 dakika veya daha az) (Şekil 17.2). Hücre büyümesi gerçekleşmeden devam eden erken embriyonik hücre döngüleri, yumurta sitoplazmasını hızla daha küçük



Şekil 17.2 Embriyonik hücre döngüsü Erken embriyonik hücre döngüleri sırasında, yumurta sitoplazması hızlı bir şekilde daha küçük hücrelere bölünür. Hücreler, G_1 ve G_2 evrelerini içermeyen, kısa S evreleriyle dönüşen M evrelerinden ibaret bu döngüler süresince büyümezler.



Şekil 17.3 Hücre DNA içeriğinin saptanması Bir hücre populasyonu, DNA'ya bağlanan bir floresan boya ile işaretlenir. Daha sonra, hücreler, her bir hücrenin floresans yoğunluğunu saptayan bir akış sitometresinden geçirilir. Elde edilen değerler, hücre sayısına karşı, hücrenin DNA içeriğiyle orantılı floresans yoğunluğu olarak işaretlenir. Dağılım, $2n$ ve $4n$ DNA'lı, sırasıyla döngünün G_1 ve G_2/M evrelerinde bulunan, hücre sayısına karşılık gelen iki tepe oluşturur. S evresindeki hücreler $2n$ ile $4n$ arasında DNA içerikleri nedeniyle, bu iki tepe arasında dağılım gösterir.

hücrelere böler. DNA replikasyonunun M evresi ile dönüşümlü çok kısa S evrelerinde gerçekleştiği embriyonik hücre döngülerinde G_1 veya G_2 evreleri yoktur.

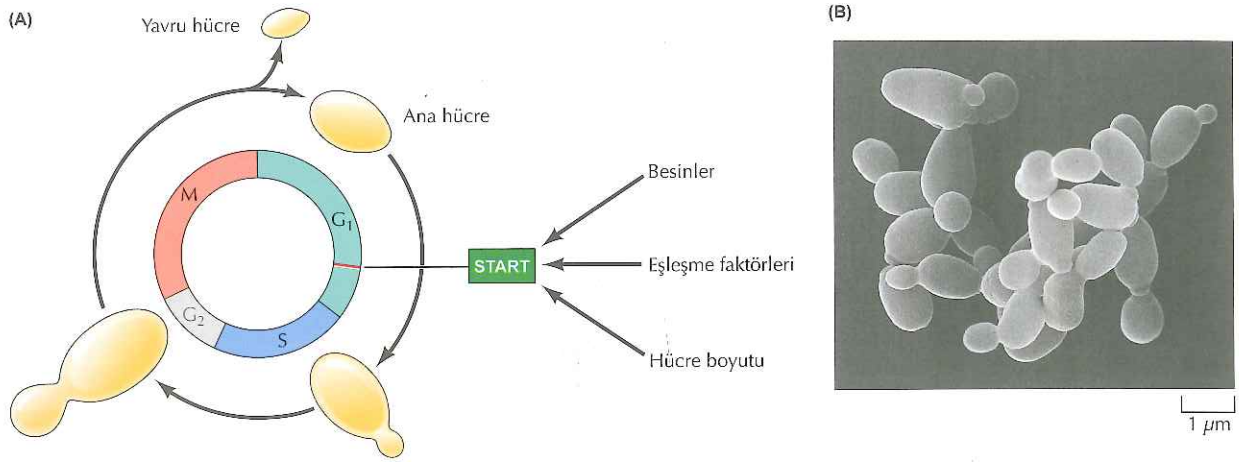
Embriyonik hücrelerin hızla çoğalmasına karşın, erişkin hayvanlarda bazı hücrelerin (örn., sinir hücreleri) bölünmesi tümüyle durmuştur ve diğer bir çok hücre de, sadece, yaralanma ya da hücre ölümü sonucu kaybedilen hücrelerin yenilenmesi gerektikçe, nadiren bölünürler. Bunlara örnek olarak, deri fibroblastları ve karaciğer gibi bazı iç organ hücreleri verilebilir. Gelecek bölümde daha geniş tartışılacağı gibi, bu hücreler G_1'den çıkarak hücre döngüsünde G_0 olarak adlandırılan, sessiz (*quiescent*) evreye girerler. G_0 evresinde, hücreler metabolik olarak aktiftirler. Uygun ekstraselüler sinyaller tarafından uyarılmadıkları sürece çoğalmazlar. G_0 evresinde durdurulmuş olan bazı hücreler, belirli ekstraselüler sinyaller tarafından uyarıldıklarında tekrar hücre döngüsüne girebilirler. Bunun aksine, erişkin hayvanlardaki farklılaşmış çoğu hücreyi de içeren diğer hücre tipleri, hücre döngüsünden kalıcı olarak çıkarlar ve tekrar çoğalmaya başlamaları mümkün değildir.

Animasyon 17.2
sites.sinauer.com/cooper7e/a17.2
Embriyonik Hücre Döngüleri
Embriyo gelişiminin erken aşamalarında gerçekleşen hücre döngülerinde, hücreler büyümek yerine giderek daha küçük hücreler oluşturacak şekilde bölünürler.

Hücre döngüsü analizi, yukarıda tartıştığımız farklı evrelerdeki hücrelerin belirlenmesini gerektirir. Mitotik hücreler mikroskobik olarak ayırt edilebilseler de, döngünün diğer evrelerindeki (G_1, S ve G_2) hücreler biyokimyasal kriterlerle saptanmalıdırlar. Genellikle, hücre döngüsünün farklı evrelerindeki hücreler DNA içeriklerine göre ayırt edilebilirler (**Şekil 17.3**). Örneğin; G_1'deki hayvan hücreleri diploiddir (her kromozomun iki kopyasını içerirler), DNA içerikleri *2n*'dir (n, genomun haploid DNA içeriğini temsil eder). S evresinde replikasyon, hücrenin DNA içeriğini *2n*'den *4n*'ye çıkarır, yani S'deki hücreler *2n* ile *4n* arasında DNA içeriğine sahiptir. G_2 ve M'deki hücrelerde DNA içeriği *4n* olarak kalır, sitokinezden sonra ise *2n*'ye iner. Hücrenin DNA içeriği, hücrelerin DNA'ya bağlanan floresan boya ile inkübasyonu sonrası **akış sitometresi** veya **floresans ile aktive olan hücre ayırıcı** (FACS) kullanılarak, floresans yoğunluğunun ölçülmesi ile belirlenir. Bu analizler sonucunda, hücrelerin G_1, S ve G_2/M evrelerinden hangisinde olduğu tespit edilir.

Hücre döngüsünün hücre büyümesi ve ekstraselüler sinyaller tarafından düzenlenmesi

Hücrelerin bölünme döngüsünde ilerlemesi, farklı evrelerde yer alan çeşitli süreçleri denetleyen içsel sinyaller kadar, çevreden gelen ekstraselüler sinyaller ile



Şekil 17.4 Tomurcuklanan maya hücre döngüsünün denetimi
(A) *Saccharomyces cerevisiae*'nın hücre döngüsü ilk önce, START olarak adlandırılan, ileri G_1'deki bir noktada denetlenir. START'tan geçiş; besinlerin varlığı, eşleşme faktörleri ve hücre boyutu tarafından kontrol edilir. Bu mayaların tomurcuklanarak bölündüklerine dikkat edin. Tomurcuklar, START'ın hemen arkasından oluşmaya başlar ve mitoz sonrasında ana hücreden ayrılana kadar büyümeye devam ederler. Tomurcuklanmayla oluşan yavru hücre, ana hücreye kıyasla küçüktür ve bu nedenle, bir sonraki hücre döngüsünün G_1 evresinde büyümek için daha fazla zamana gereksinir. Tomurcuklanan mayanın hücre döngüsünde, G_1 ve S evreleri normal olmasına karşın, mitotik iğ S evresinde oluşmaya başlar ve belirgin bir G_2 evresi bulunmaz. (B) S. *cerevisiae*'nın taramalı elektron mikroskop görüntüsü. Tomurcuğun boyutu, hücrenin döngüdeki yerini gösterir.

de düzenlenir. Hücre döngüsünün ekstraselüler sinyaller ile düzenlenmesine örnek olarak, hayvan hücresi çoğalmasında büyüme faktörlerinin etkisi verilebilir. Buna ek olarak, hücre büyümesi, DNA replikasyonu ve mitoz gibi farklı hücresel süreçlerin hepsi, hücre döngüsü sürecinde denetlenmelidir. Hücre döngüsünün farklı evrelerinde düzenlenme, bir seri kontrol noktası ile sağlanır.

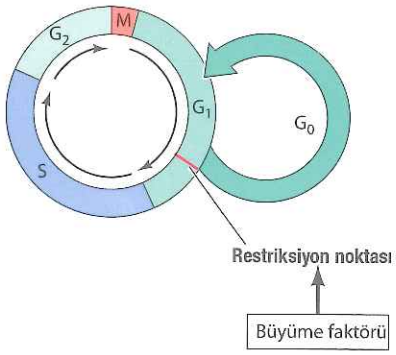
Birçok hücre tipinde, en önemli düzenleyici noktalardan birisi G_1'in sonlarında bulunur ve G_1'den S'ye geçişi denetler. Bu düzenleyici nokta ilk kez, tomurcuklanan maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ile yapılan çalışmalarda saptanmış ve **START** olarak adlandırılmıştır (**Şekil 17.4**). Hücreler START'ı bir kez geçince, S evresine girmeleri ve hücre döngüsünü tamamlamaları kaçınılmazdır. Ancak, START noktasından geçiş, maya hücre döngüsünde ileri düzeyde denetlenen ve hücre büyüklüğü kadar besin varlığı gibi dış sinyaller ile de kontrol edilen bir olaydır. Mayalar, besin yetersizliği durumunda döngüyü START noktasında durdururlar ve dinlenme evresine girerler. Yani, START noktası hücre için, bölünmeyi tamamlamak için yeterli besinin bulunup bulunmadığına karar verme noktasıdır. Maya eşleşmesini uyaran polipeptid faktörler de START noktasında hücre döngüsünü durdururlar ve haploid maya hücrelerinin, S evresinde ilerlemek yerine birleşmelerine olanak sağlarlar.

START, ekstraselüler sinyallerle denetlenen bir karar noktası olmanın yanı sıra, hücre büyümesinin, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi ile koordine edildiği noktadır. Bu denetimin önemi özellikle, hücre bölünmesinin farklı büyüklüklerde yavru oluşturduğu tomurcuklanan mayalarda çok belirgindir: Büyük bir ana ve küçük bir yavru hücre. Maya hücrelerinin sabit büyüklüğü

koruyabilmesi için, tekrar bölünmeden önce yavru hücrenin, büyük ana hücreden daha fazla büyümesi gereklidir. Bu yüzden, hücre büyümesini diğer hücre döngüsü olayları ile ayarlamak için, hücre büyüklüğünün gözlenmesi gereklidir. Bu kontrol, START noktasını geçebilmek için her hücrenin minimum büyüklüğe ulaşmasını gerektiren bir kontrol mekanizması ile sağlanır. Sonuç olarak, küçük yavru hücre G_1'de ana hücreye göre daha uzun süre kalır ve daha fazla büyür.

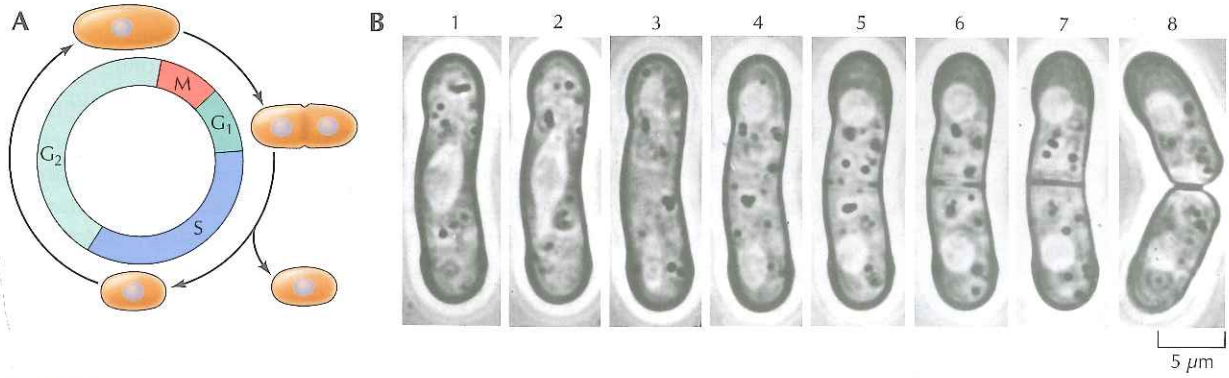
Hayvan hücrelerinin çoğalması da, benzer şekilde, hücre döngüsünün G_1 evresinde denetlenir. Özellikle, hayvan hücrelerinde G_1'in sonlarında, **restriksiyon noktası** olarak adlandırılan ve mayalardaki START'a benzer işlev gören bir karar noktası bulunur (**Şekil 17.5**). Ancak, mayaların aksine, hayvan hücrelerinin döngüsü, besin olanaklarıyla değil, hücre çoğalmasını uyaran ekstraselüler büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Uygun büyüme faktörlerinin varlığında, hücre restriksiyon noktasından geçerek S evresine girer. Hücre restriksiyon noktasından bir kere geçtikten sonra, büyüme faktörü uyarısı olmasa dahi, S evresine ve hücre döngüsünün kalan kısmına ilerlemek zorundadır. Diğer taraftan, eğer G_1'de uygun büyüme faktörleri yoksa, hücre döngüsü restriksiyon noktasında durur. Bu şekilde duraklatılmış hücreler, hücre döngüsünde G_0 olarak adlandırılan durağan evreye girerler ve çok uzun süreler çoğalmadan kalabilirler. G_0 hücrelerinin büyümesi durmuş ve protein sentez hızı azalmış olsa da, metabolik olarak aktiftirler. Daha önce belirtildiği gibi, çoğu hayvan hücresi uygun ekstraselüler sinyallerle uyarılmadıkları sürece G_0'da kalırlar. Örneğin; deri fibroblastları, yaralanma sonucu onarım gerektiğinde bölünme için uyarılıncaya kadar G_0 evresinde tutulurlar. Bu hücrelerin çoğalması, trombositlerce salgılanan ve yaralanmış dokuya komşu fibroblastların çoğalmasını uyaran, platelet kökenli büyüme faktörü tarafından tetiklenir.

Hücrelerin çoğunda çoğalma, öncelikli olarak, G_1'de denetlenmesine karşın, bazı hücre döngüleri G_2'de kontrol edilir. Buna bir örnek, bölünen maya *Schizosaccharomyces pombe*'nin hücre döngüsüdür (**Şekil 17.6**). *Saccharomyces cerevisiae*'nın aksine, *S. pombe*'nin hücre döngüsü, öncelikli



Şekil 17.5 Hayvan hücre döngüsünün büyüme faktörleriyle düzenlenmesi Büyüme faktörlerinin varlığı, hayvan hücre döngüsünü, geç G_1'de, restriksiyon noktası denilen noktada kontrol eder. G_1 evresinde büyüme faktörleri yoksa, hücreler döngüde, G_0 denilen devinimsiz (*quiescent*) evreye girerler.

Video 17.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v17.2
Bölünen Mayaların Bölünmesi Bölünen mayalar, medial bölünme ile ortadan ikiye ayrılarak iki yavru hücre oluştururlar. Bu neden hücre döngüsü araştırmalarında güçlü bir model olarak kabul görür.



Şekil 17.6 Bölünen mayanın hücre döngüsü (A) Bölünen mayalar, her iki ucundan uzayarak büyür ve hücrenin ortasında bir duvar oluşturarak bölünürler. Tomurcuklanan mayaların döngüsünün aksine, bölünen mayaların hücre döngüsü normal G_1, S, G_2 ve M evreleri içerir. Sitokinezin G_1'de gerçekleştiğine dikkat ediniz. Hücrenin uzunluğu, döngünün hangi evresinde olduğunu gösterir. (B) *Schizosaccharomyces pombe*'nin, birbirini izleyen mitoz ve sitokinez aşamalarının mikroskop görüntüleri. (B, C. F. Robinow'un izniyle, University of Western Ontario.)

olarak hücre büyüklüğü ve besin düzeyinin gözetildiği temel nokta olan, G_2'den M'ye geçişte denetlenir. Hayvanlarda hücre döngüsünün G_2'de kontrolüne temel örnek oositlerdir. Omurgalı oositleri, hormonal uyarıyla M evresine geçiş tetikleninceye kadar, uzun süre (insanlarda birkaç on yıl) G_2'de kalırlar. Yani ekstraselüler sinyaller, hücre döngüsünün G_1'den S evresine geçişinin yanısıra G_2'den M'ye geçişi de düzenleyerek hücre çoğalmasını denetlerler.

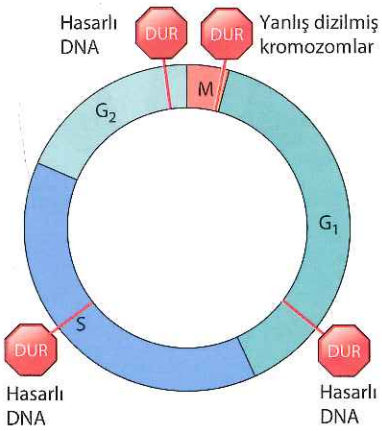
Hücre döngüsü kontrol noktaları

Önceki kısımda tartışılan kontroller, döngüyü besin ve büyüme faktörleri gibi ekstraselüler sinyaller ile hücre büyüklüğüne göre düzenler. Ayrıca, hücre döngüsünün farklı evrelerindeki olayların, uygun düzenle gerçekleşebilmesi için, koordineli olmaları gereklidir. Örneğin, replikasyon tamamlanmadan hücrenin mitoza girmemesinin kritik önemi vardır. Hücrelerin çoğunda, hücre döngüsünün farklı evreleri arasındaki düzen, bir seri **hücre döngüsü kontrol noktasına** bağlıdır. Bu kontrol noktaları, hücre döngüsü sırasında bir önceki evredeki olaylar tamamlanmadan sonraki evreye geçişi engellerler.

Animasyon 17.3
sites.sinauer.com/cooper7e/a17.3
Hücre Döngüsündeki Kontrol Noktaları Hücre döngüsü boyunca görev alan farklı kontrol noktaları genomun bütününün kardeş hücrelere aktarılmasını sağlarlar.

Hücre döngüsünde **DNA hasarı kontrol noktası** olarak adlandırılan kontrol noktaları, hasara uğramış DNA'nın kopyalanarak yavru hücrelere bu şekilde geçmemesi için işlev görür (Şekil 17.7). Bu kontrol noktaları, replike olmamış ya da hasarlı DNA'lara duyarlıdır ve DNA replikasyonunun tamamlanması ya da onarımı ile, hücre döngüsünün devam etmesini ayarlarlar. DNA hasarı kontrol noktaları hücre döngüsünün G_1, S ve G_2 evrelerinde görevlidirler. Örneğin, G_2'deki kontrol noktası DNA replikasyonu tamamlanmadan ya da hasara uğramış DNA tamir edilmeden mitozun başlamasına engel olur. Bu tür hasarlı DNA'lar hücre döngüsünü duraksatan bir sinyal yolağını aktive ederler. Bu sayede, G_2'deki kontrol noktasının işletilmesiyle genom tamamiyle replike olmadan veya hasara uğramış DNA tamir edilmeden M evresine geçiş engellenir. Ancak bundan sonra G_2'deki inhibisyon ortadan kalkar ve hücre mitoza geçerek, tümüyle replike olmuş kromozomları yavru hücrelere dağıtır. Aynı şekilde, G_1 kontrol noktasında duraklama, hasarlı DNA'nın, S evresine girmeden onarılabilmesine olanak sağlar ve DNA'nın hasarlı olarak kopyalanmasını engeller. S evresi kontrol noktası, DNA'nın bütünlüğünü sürekli denetleyerek hasarlı DNA'nın onarılmadan kopyalanmasını engellediği gibi aynı zamanda kalite kontrol işleviyle DNA replikasyonu sırasında ortaya çıkabilen, yanlış bazların eklenmesi veya DNA segmentlerinin eksik kopyalanması gibi hataların tamir edilmesini sağlar.

Genomun bütünlüğünü koruyan, diğer bir önemli hücre döngüsü kontrol noktası da, mitozun sonlarında yer alır. **İğ kontrol noktası** olarak bilinen bu kontrol noktası, kromozom setinin yavru hücrelere tam ve doğru dağıtılması için kromozomların, mitotik iğ üzerindeki dizilimini gözlemler. İğ üzerinde bir ya da daha fazla kromozomun uygun yerleşmemesi, kromozomların yavru nükleuslara dağılımından önce, metafazda duraklatılmasına neden olur.



Şekil 17.7 Hücre döngüsü kontrol noktaları Yavru hücrelere, genomun tamamının eksiksiz bir şekilde aktarılması çeşitli kontrol noktaları sayesinde garanti edilir. G_1, S ve G_2 evrelerindeki DNA hasarı kontrol noktası, hasarlı ya da henüz kopyalanmamış DNA'nın varlığında hücre döngüsünü durdurur. İğ kurulumu kontrol noktası, eğer kromozomlar mitotik iğ iplikleri üzerinde düzgün dizilmedilerse mitozu durdurur.

İğ kontrol noktası, kromozomların her bir yavru hücreye dağılmak üzere tümüyle organize olmadan ayrılmamalarını sağlar.

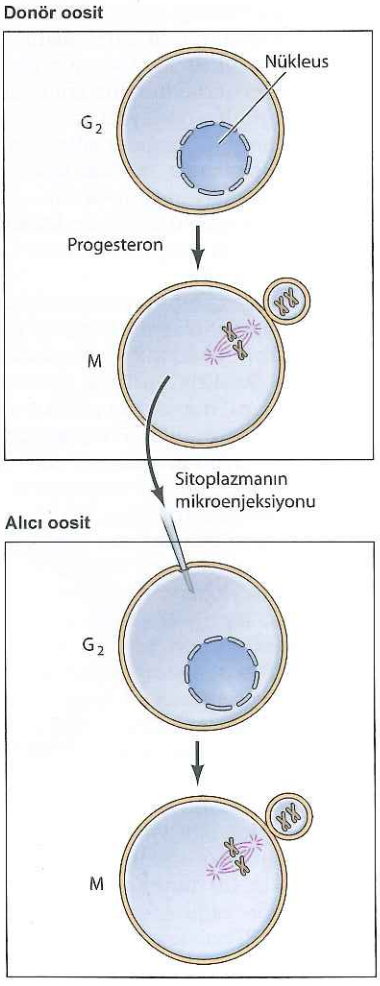
Hücre Döngüsü İlerlemesinin Düzenleyicileri

Günümüz hücre biyolojisinde en heyecan verici gelişmelerden biri, ökaryot hücrelerin bölünme döngüsünde ilerlemesini kontrol eden moleküler mekanizmaların anlaşılmaya başlanmasıdır. Hücre döngüsünün düzenlenmesi ile ilgili şu anki bilgilerimiz; maya, deniz kestanesi, kurbağa ve memeliler gibi, geniş yelpazedeki organizmalar üzerinde yapılan deneylerden elde edilen verilerin ilişkilendirilmesiyle oluşturulmuştur. Bütün bu çalışmalar, tüm ökaryotların hücre döngülerinin, korunmuş bir seri protein kinaz tarafından kontrol edildiğini göstermektedir ve bu protein kinazlar temel hücre döngüsü geçişlerinden sorumludur.

Protein kinazlar ve hücre döngüsünün düzenlenmesi

Hücre döngüsü düzenlenmesinden sorumlu anahtar moleküllerin belirlenmesinde üç farklı deneysel yaklaşımdan yararlanılmıştır. Bu yaklaşımlardan ilki, kurbağa oositleri ile yapılan çalışmalarla başlamıştır (**Şekil 17.8**). Bu oositler, mayozun M evresine girişleri hormonla tetikleninceye kadar, hücre döngüsünün G_2 evresinde duraklatılırlar (ileride tartışılacak). Birbirinden bağımsız iki araştırıcı grubu (Yoshio Masui ve Clement Markert; Dennis Smith ve Robert Ecker), 1971'de hormonla uyarılmış oositlerden alınan sitoplazmanın mikroenjeksiyonla, G_2'de duran oositlere verilmesinin, bu yumurtaların M evresine girişini uyardığını buldular. Yani, hormon uygulanmış oositlerde var olan bir sitoplazmik faktör, hormon uygulanmamış oositlerde G_2'den M'ye geçişi uyarıyordu. Oositlerin mayoza geçişi genellikle yumurta olgunlaşması olarak kabul edildiğinden, bu sitoplazmik faktör **olgunlaşmayı ilerleten faktör (MPF)** olarak adlandırıldı. Ancak, daha sonraki çalışmalar, MPF aktivitesinin oositlerin mayoza girişiyle sınırlı olmadığını gösterdi. Aksine, MPF somatik hücrelerde de bulunur ve hücrelerin, mitotik döngünün M evresine girişini uyarır. Oositlere özgün olmak yerine, MPF'nin, G_2'den M'ye geçişte genel düzenleyici olarak davrandığı görülmektedir.

Hücre döngüsü düzenlenmesinin anlaşılması için ikinci yaklaşım, 1970'lerin başlarında Lee Hartwell ve çalışma arkadaşlarının öncülüğünü yaptığı, mayaların genetik analiziydi. Tomurcuklanan maya *Saccharomyces cerevisiae* ile çalışan bu araştırıcılar, hücre döngüsü bozuk olan, sıcaklığa duyarlı mutantlar tanımladılar. Bu mutantların (*cdc* olarak adlandırılırlar) ana karakteristikleri, hücre döngüsünün belirli noktalarında büyümelerinin durmasıydı. Örneğin; *cdc28* olarak isimlendirilen önemli bir mutant, START noktasında hücre döngüsünün duraklamasına sebep olur ki, bu da *Cdc28* proteininin G_1'deki kritik düzenleyici noktadan geçişte gerekli olduğunu



Şekil 17.8 MPF'nin tanımlanması Kurbağa oositleri hücre döngüsünün G_2 evresinde durduruldu ve mayozun M evresine giriş, progesteron hormonuyla uyarıldı. Burada şematize edilmiş olan deneyde, G_2'de durdurulmuş olan oositlere, G_2'den M'ye geçmiş olan hücrelerin sitoplazması mikroenjeksiyonla aktarıldı. Sitoplazmanın bu şekilde aktarılması, hormon uyarımı olmadan G_2, M geçişini indükledi ve böylece, mayozun M evresine girişi uyarmak için sitoplazmadaki bir faktörün (MPF) yeterli olduğu gösterildi.

Anahtar Deney

MPF'nin Keşfi

Cytoplasmic Control of Nuclear Behavior during Meiotic Maturation of Frog Oocytes

Yoshio Masui ve Clement L. Markert
Yale University, New Haven, CT
Journal of Experimental Zoology, 1971, Volume 177, Pages 129-146

Bağlam

1960'larda yapılan çekirdek nakli ve hücre füzyon deneyleri, mitotik hücre döngüsünün farklı evrelerindeki hücrelerin içine aktarılan nükleusların, genellikle, konakçı hücrenin davranışını benimsediğini göstermiştir. Böylece, nükleer mitotik aktivitenin sitoplazma tarafından düzenlendiği anlaşıldı. Ancak, nükleusların mitotik aktivitesini kontrol ettiği varsayılan sitoplazmik faktörlerin varlığının gösterilmesi için, doğrudan deneysel yaklaşıma gerek vardı. Kurbağa oositlerinin mayozu sırasında, nükleer davranışı düzenleyen sitoplazmik faktörlerin rolünü araştıran Masui ve Markert'in çalışmaları ile bu gösterilmiş oldu.

Kurbağa oosit mayozunun bazı özellikleri, sitoplazmik faktörler tarafından kontrol edildiğini düşündürmüştür. Özellikle, kurbağa oositlerinin mayozu, mayoz I'in profazının sonunda durdurulur. Progesteron hormonu uygulanması, somatik hücrelerin G_2'den M'ye geçişine benzer şekilde, mayozu, kaldığı yerden, yeniden başlatır. Oositler, daha sonra, mayoz II'nin metafaz evresinde, döllenme oluncaya kadar ikinci bir duraklamaya girerler. Masui ve Markert, hormon uygulamasının ve döllenmenin her ikisinin de mayoz üzerinde etkilerinin, ikincil olarak nükleus davranışını denetleyen sitoplazma değişikliklerine bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu hipotezlerini, hormonla uyarılmış oositten aldıkları sitoplazmayı, uyarılmamış oosite transfer ederek test ettiler. Bu deneyler, Masui ve Markert'in, olgunlaşmayı sağlayan faktör (MPF) olarak adlandırdıkları bir sitoplazmik faktörün, hormon uygulaması sonunda mayozun başlatılmasından sorumlu olduğunu göstermiştir.

Deneyler

Kurbağa oositleri, büyüklükleri ve cam mikropipet enjeksiyonu sonrasında yaşayabilme özelliklerinden dolayı, sitoplazmik faktörlerin aktivitelerinin test edilmesinde, çok uygun bir deneysel sistem olmuşlardır. Masui ve Markert'in deneylerinin temel tasarımı, progesteron verilerek mayozun tekrar başlatıldığı, verici oositlerden sitoplazmanın çıkartılması idi. Daha sonra bu sitoplazma farklı miktarlarda, uyarılmamış alıcı yumurtalara enjekte edildi. Sonuç olarak, verici oositlere hormon uygulamasından altı ya da daha fazla saat sonra alınan sitoplazmalar, enjekte edildikleri alıcılarda mayozun yeniden başlamasını sağladılar (şekle bakınız). Buna karşın, progesterona maruz bırakılmamış kontrol oositlerden alınan sitoplazmanın enjeksiyonu ise alıcılar üzerinde hiçbir etki göstermedi. Böylece, hormon uygulanan oositlerin, progesterona hiç maruz kalmamış alıcılarda mayozu yeniden başlatabilme özelliğine sahip sitoplazmik faktörleri içerdiği gösterilmiş oldu.

Kontrol deneyleri, verici sitoplazmasında progesteronun kendisinin mayoz başlatıcı faktör olma olasılığını ortadan kaldırmıştır. Özellikle, alıcı yumurtaların içine enjekte edilen progesteronun mayozu başlatamaması bunu göstermiştir. Hormonun sadece dışarıdan uygulanması halinde etkili olması, progesteronun, belirli bir sitoplazmik faktörü aktive etmek için, yüzey reseptörü üzerinden etkilediğini göstermektedir. Dennis Smith ve Robert Eckler tarafından 1971'de bağımsız olarak yürütülen benzer deneyler aynı sonuca ulaşmıştır.

İlginç olan, progesteronun bu sistemdeki davranışının birçok hücredeki davranışından farklı olmasıdır, çünkü progesteron normalde plazma zarından geçer ve hücre-içi reseptöre bağlanır (bkz Bölüm 16). Ancak, oositlerde progesteron sadece hücre yüzeyinde etkilidir ve

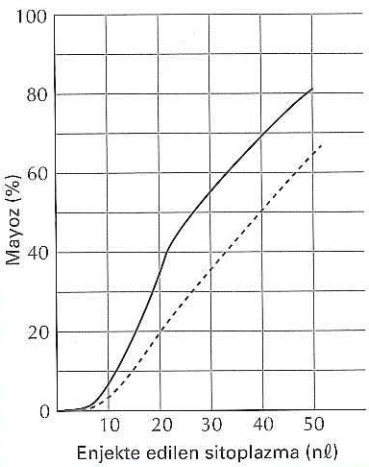
Yoshio Masui

Clement Markert

oosit sitoplazması içinde belli bir faktörü aktive eder. Oosit mayozunun yeniden başlaması çoğunlukla oosit olgunlaşması olarak adlandırıldığından, Masui ve Markert yeni keşfettikleri mayoz düzenleyicisine "olgunlaşmayı ilerleten faktör" adını uygun gördüler.

Etki

Kurbağa oositlerinde keşfedilmesinin ardından, MPF'nin somatik hücrelerde de bulunduğu ve hücrenin G_2'den M'ye geçişini başlattığı gösterildi. Sonuçta, MPF'nin hem



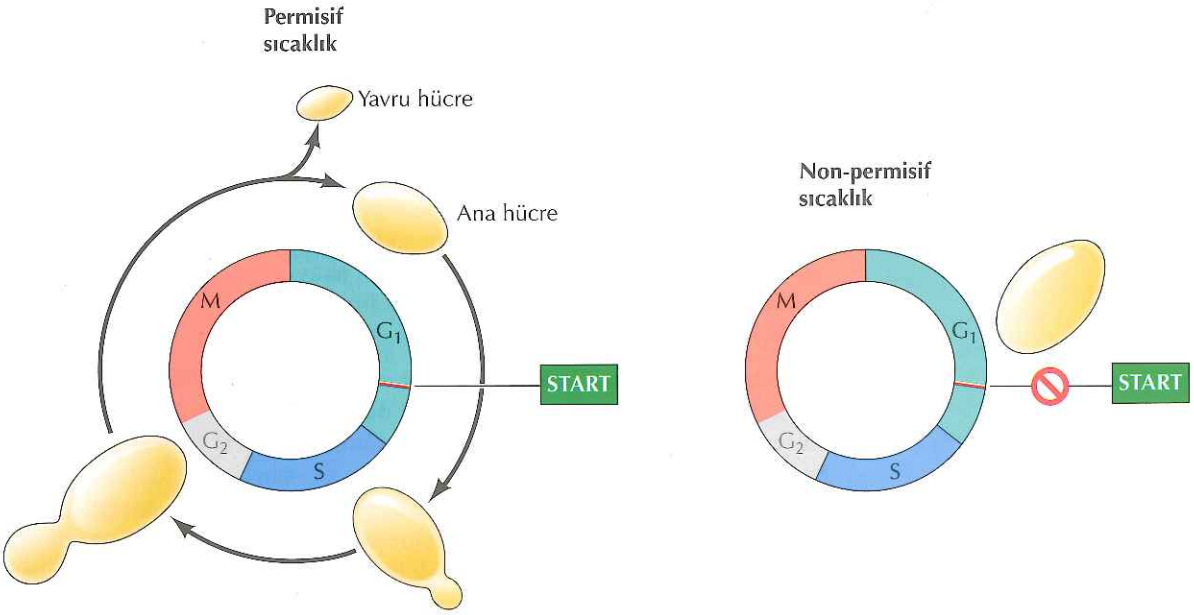
Alıcı oositlere, progesteron ile muamele edilmiş oositlerden alınan sitoplazmanın belirli miktarları enjekte edildi. Vericinin sitoplazması ya oositin merkezinden bir mikropipet ile alınır (düz çizgi), ya da tüm oositlerin homojenizasyonu ile hazırlanır (kesik çizgi). Sonuçlar, mayozu sürdürmeye uyarılan, enjekte edilmiş oositlerin yüzdesi olarak verilmiştir.

Anahtar Deney

mitotik hem de mayotik hücre döngülerinin M evresine girişindeki genel düzenleyici olduğu ortaya çıktı. Sonunda, MPF'nin 1988 yılında kurbağa oositlerinden saflaştırılması, maya genetiği ve deniz kestanesi embriyolarıyla bu önemli hücre döngüsü düzenleyicisinin kimliğinin açıklanması amacıyla yapılan çalışmalarla, aynı noktada birleşti. Şöyle ki, MPF'nin siklin B ve Cdk1 protein kinazın bir dimeri olduğu bulundu. Daha sonraki çalışmalar, siklin B ve Cdk1'in büyük protein ailelerinin üyeleri olduğunu, farklı siklinlerin ve Cdk1 benzeri protein kinazların, diğer hücre döngüsü geçişlerinin düzenlenmesinde MPF'ye analog olarak fonksiyon gösterdiğini saptadı. Kurbağa oositlerinde MPF'nin keşfi, tüm ökaryotlarda korunmuş olan hücre döngüsünü düzenleyici-sistemin anlaşılmasına yol açtı.

göstermektedir (**Şekil 17.9**). Benzer hücre döngüsü mutantları, Paul Nurse ve arkadaşları tarafından *Schizosaccharomyces pombe* (bölünen maya)'de izole edildi. Bu mutantlardan *cdc2*, *S. pombe* hücre döngüsünü hem G_1'de, hem de temel düzenleyici nokta olan G_2'den M'ye geçişte durdurur. Daha sonraki çalışmalar, *S. cerevisiae cdc28* ve *S. pombe cdc2*'nin işlevsel olarak homolog genler olduğunu ve her iki maya türünde de, hem START noktasından geçişte, hem de mitoza girişte gerekli olduklarını gösterdi. Daha sonraki çalışmalar *cdc2* ve *cdc28* genlerinin bir protein kinaz enzimini kodladığını göstererek, protein fosforillenmesinin hücre döngüsünün kontrolündeki önemine dair ilk kanıtları oluşturmuştur. Bunlara ek olarak, insanlarda ve diğer ökaryotlarda benzer genler tanımlanmıştır. Mayalarda *cdc2* ve *cdc28* genleri tarafından kodlanan protein kinazın tüm ökaryotlarda korunmuş bir hücre döngüsü düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. Bu kinaz **Cdk1** olarak adlandırılmıştır.

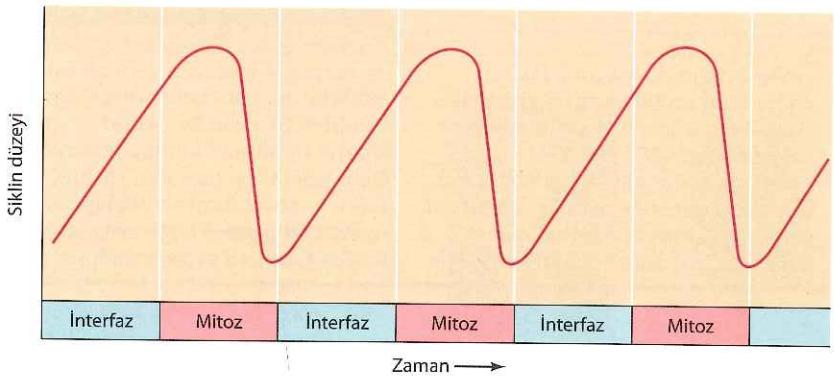
MPF'nin bulunması ve maya genetiği ile aynı noktada birleşen üçüncü araştırma dizisi, denizkestanesi erken embriyolarındaki protein sentezi çalışmalarından doğmuştur. Döllenmeyi takiben bu embriyolar bir seri hızlı hücre bölünmesine uğrarlar. Beklenmedik şekilde, protein sentezi inhibitörleri



Şekil 17.9 S. *cerevisiae cdc28* mutantlarının özellikleri Sıcaklığa duyarlı *cdc28* mutantı, permisif (izin veren) sıcaklıkta normal şekilde çoğalır. Ancak, non-permisif (izin vermeyen) sıcaklıkta, hücre döngüsünde ilerleme START'da durur.

Bilgi için

Paul Nurse ve arkadaşlarının Edinburgh Üniversitesi'nde izole ettikleri bazı *S. Pombe* hücre döngüsü mutantları, hücrelerin normalden küçük olmalarına rağmen bölünmeleri sayesinden belirlenmiştir. Bu mutantlar İskoç dilinde küçük anlamına gelen *Wee* olarak adlandırılmışlardır.

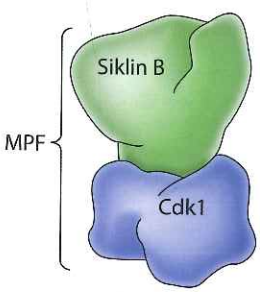


Şekil 17.10 Deniz kestanesi embriyosunda siklin birikimi ve yıkımı Siklinler, interfaz boyunca birikip, mitozun sonuna doğru hızla yıkılan proteinler olarak tanımlanır.

ile yapılan çalışmalar, bu embriyonik hücre döngülerinin M evresine girebilmek için yeni protein sentezine ihtiyaç duyduklarını gösterdi. Tim Hunt ve çalışma arkadaşları 1983'de, denizkestanesi ve deniz tarağı embriyolarında periyodik olarak biriken ve parçalanan iki protein tanımladılar. Bu proteinler interfaz boyunca birikip, daha sonra her mitozun sonuna doğru hızla parçalanırlar (**Şekil 17.10**). Hunt, bu proteinleri **siklinler** (İki protein, siklin A ve siklin B olarak adlandırılmışlardır.) olarak isimlendirdi ve bunların periyodik birikim ve yıkılımlarının, M evresine giriş ve çıkışı kontrol ederek mitozu tetikleme fonksiyonlarının olabileceğini ileri sürdü. Joan Ruderman ve çalışma arkadaşları 1986 yılında, kurbağa oositlerine siklin A mikro enjeksiyonunun G_2'den M'ye geçişi tetiklemek için yeterli olduğunu göstererek siklinlerin bu basamaktaki doğrudan rolünü tanımladılar.

Başlangıçta birbirinden bağımsız olan bu yaklaşımlar, 1988'de James Maller'in laboratuarında kurbağa yumurtalarından MPF'nin saflaştırılmasından sonra, çarpıcı bir şekilde birbiri ile ilişkili hale geldi. Bir kaç laboratuvarda MPF'nin moleküler niteliğinin belirlenmesi, hücre döngüsünün bu korunmuş düzenleyicisinin iki alt birimden meydana geldiğini göstermiştir: Cdk1 ve siklin B (**Şekil 17.11**). Düzenleyici alt birim siklin B, Cdk1 protein kinazın katalitik aktivitesi için gereklidir. Bu durum, MPF aktivitesinin, hücre döngüsünün ilerlemesi sırasında siklin B'nin periyodik birikimi ve parçalanması ile kontrol edildiği fikrini destekleyici niteliktedir.

Daha sonra yapılan çeşitli çalışmalar, siklin B'nin bu rolünü doğruladıkları gibi, MPF'nin Cdk1'in fosforillenme ve defosforillenme ile denetlendiğini de göstermiştir (**Şekil 17.12**). Memeli hücrelerinde siklin B sentezi S evresinde başlar. Siklin B daha sonra birikerek S ve G_2 süresince Cdk1 ile birlikte kompleks oluşturur. Bu kompleksler oluştuğunda, Cdk1, iki önemli kontrol noktasından fosfatlanır. Bu fosforillenmelerden biri treonin-161 üzerinde olur ve Cdk1 kinaz aktivitesi için gereklidir. İkincisi, omurgalılarda tirozin-15



Şekil 17.11 MPF'nin yapısı MPF, siklin B ve Cdk1 protein kinazdan oluşan bir dimerdir. Siklin B, Cdk1'in katalitik aktivitesi için gereklidir.

Anahtar Deney

Siklinlerin Tanımlanması

Cyclin: A Protein Specified by Maternal mRNA in Sea Urchin Eggs That Is Destroyed at Each Cleavage Division

Tom Evans, Eric T. Rosenthal, Jim Youngblom, Dan Distel, and Tim Hunt, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA

Cell, 1983, Volume 33, Pages 389-396.

Bağlam

Tim Hunt ve çalışma arkadaşları, deniz kestanesi yumurtalarında döllenmeyi izleyen protein sentezini incelemeye karar verdiler. Amaçları, erken embriyonik gelişim sırasında hücrelerin bölünebilmesi için ihtiyaç duyulan proteinlerin belirlenmesiydi. Geçmişte yapılmış olan farklı çalışmalar, döllenmemiş yumurtalarda depolanmış olan maternal (anne kaynaklı) mRNA'ların translasyonlarının döllenme ile birlikte uyarıldığını, ve bunun sonucu olarak döllenme sonrasında protein sentezi profilinde göze çarpan değişikliklerin olduğunu göstermekteydi. Ayrıca, protein translasyonu inhibitörleri ile yapılan çalışmalar, erken embriyonik gelişim sırasında protein sentezinin gerekli olduğunu kanıtlar nitelikteydi. Örneğin, deniz kestanesi yumurtalarında döllenmeden sonra protein sentezinin engellenmesi, nükleer zarfın yıkılması, kromozomların yoğunlaşması ve iğ ipliklerinin oluşumu olaylarını bloke etmekteydi. Bu deneysel bulgular, embriyonik hücre bölünmeleri için, döllenmiş yumurtalarda maternal mRNA'lardan elde edilen proteinlerin gerekli olduğu fikrini vermekteydi.

Hunt ve çalışma arkadaşları, döllenmiş yumurtalarda protein sentezini inceleyen çalışmalar yaparak, hücre bölünmesinde görev alan yeni sentezlenen proteinleri belirlemeyi amaçlıyorlardı. Gerçekleştirdikleri deneysel çalışmalar, siklinlerin bulunmasına ve ökaryotik hücrelerin bölünme döngüsünü düzenleyen temel mekanizmaların aydınlantılmasına yol açtı.

Deneyler

Döllenmemiş ve döllenmiş deniz kestanesi yumurtaları radyoaktif metionin bulunan ortamda inkübe edildi, ve yeni sentezlenmiş proteinlerin belirlenmesi amacıyla hücre ekstreleri jel elektroforezi ile analiz edildi. Döllenmiş yumurtalarda, daha önce başka canlıların yumurtalarında da görüldüğü gibi belirgin birkaç proteinin sentezlenmiş olduğu gözlemlendi. Dahası, radyoaktif olarak işaretlenmiş protein profillerinin döllenmeden sonra farklı zamanlarda daha dikkatlice incelenmesi şaşırtıcı bir sonucu açığa çıkardı. Hunt ve çalışma arkadaşları, döllenmeden sonra 10 dakikalık aralıklarla ortamda bulunan proteinleri analiz ederek, henüz yeni döllenmiş yumurtalarda belirgin olan ama 85 dakika içinde neredeyse tamamen kaybolan bir proteini buldular. Bu proteinin seviyesi, döllenmeden 95 dakika sonra yeniden belirgin düzeye yükselirken, 30 dakika sonra ortamdan yine kaybolmaktaydı. Bu protein, ortamdaki seviyesinde gözlemlenen bu periyodik osilasyonlar nedeniyle "siklin" olarak adlandırıldı.

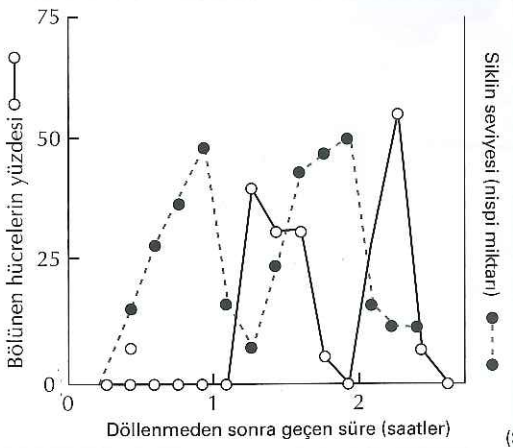
Siklin seviyesindeki osilasyonlar ile gelişen deniz kestanesi embriyolarında hücre bölünmesinin zamanlaması karşılaştırıldığında daha da çarpıcı bir sonuç elde edildi (bkz. Şekil). Döllenmiş yumurtanın iki-hücreli embriyoyu oluşturmak üzere gerçekleştirdiği ilk bölünme, döllenmeden 85 dakika sonra gerçekleşmekte ve siklin seviyesindeki

Tim Hunt

azalmayla eş zamanlı olmaktaydı. Bu ilk hücre bölünmesinden sonra siklin seviyeleri artmakta ve 125 dakika sonra, ikinci embriyonik hücre bölünmesiyle eş zamanlı olacak şekilde yeniden azalmaktaydı. Daha sonraki deneyler, siklinlerin döllenmeden sonra kesintisiz şekilde sentezlendiklerini ama her bir hücre bölünmesinden önce hızlıca yıkıma uğradıklarını gösterdi.

Etki

Hunt ve çalışma arkadaşları, embriyonik hücre bölünmeleriyle eş zamanlı gerçekleşen periyodik degredasyonu nedeniyle, "siklinlerin hücre bölünmesiyle ilişkili proseslerle bağlantısız olduğuna inanmanın oldukça zor olduğu" sonucuna ulaştılar. Ancak, siklinlerin biyolojik aktivitelerini gösteren deneylerin yokluğunda, bu sonuç için direkt bir kanıtları yoktu. Yine de, MPF aktivitesinin hücre döngüsü sırasında periyodik olarak artıp azaldığı bilinmekteydi ve yeni deneyler aktif MPF oluşumu için protein sentezinin gerekli olduğunu göstermişti. Siklin ve MPF arasındaki bu benzerlikler, Hunt ve



Deniz kestanesi yumurtaları döllenmiş, 5 dakika sonra ortama radyoaktif metionin eklenmiştir. Daha sonra, her 10 dakikalık aralıklarda örnekler toplanarak jel elektroforezi ile analiz edilmiş ve siklin seviyeleri belirlenmiştir. Paralel olarak, örnekler mikroskop altında incelenerek hücre bölünmesi gerçekleştiren hücrelerin yüzdesi hesaplanmıştır.

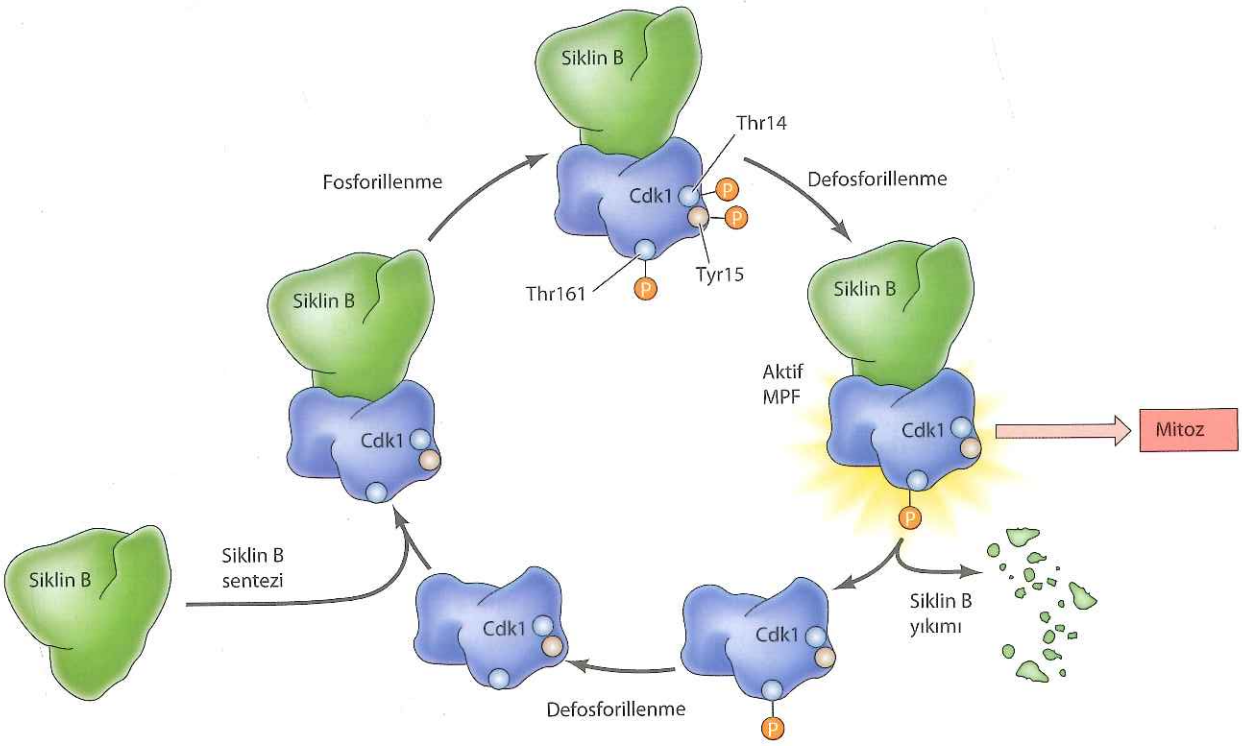
(Sonraki sayfada devam edecek)

Anahtar Deney

ekibinin MPF ile direkt bir bağlantı önermesini sağladı. MPF, biyolojik aktivite olarak tanımlanırken, siklin, hücre döngüsü sırasında seviyesi periyodik osilasyonlarla artıp azalan bir protein olarak tanımlandı. Joan Ruderman ve araştırma grubunun gerçekleştirdiği sonraki deneyler, siklin enjeksiyonunun kurbağa oositlerini mayoz bölünmeye indüklediğini gösterdi. Böylece siklin, MPF'in biyolojik aktivitesine sahip oluyordu. Siklin ve MPF arasındaki biyokimyasal ilişki, James Maller'in laboratuvarında kurbağa yumurtalarından MPF'nin izole edilmesiyle, ve daha sonra MPF'nin bir siklin B ve Cdk1 dimeri olarak karakterize edilmesiyle kanıtlandı. Tim Hunt ve çalışma arkadaşları tarafından keşfedilen siklin B'nin periyodik degredasyonu, mitoza girişte ve mitozdan çıkışta Cdk1 aktivitesini kontrol etmektedir. Ek olarak, diğer siklinler, hücre döngüsünün farklı evreleri arasındaki geçişlerde benzer roller oynamaktadırlar. Dolayısıyla, siklinin deniz kestanesi embriyolarında osile eden bir protein olarak belirlenmesi, hücre döngüsünün düzenlemesinin moleküler temellerini aydınlatmada anahtar olmuştur.

ve buna komşu treonin-14'ün fosforillenmesidir. Weel olarak adlandırılan bir protein kinaz tarafından katalizlenen Tirozin-15 fosforilasyonu, Cdk1 aktivitesini engelleyerek, S ve G_2 süresince inaktif Cdk1/siklin B komplekslerinin birikimine neden olur. G_2'den M'ye geçiş ise, Cdc25C olarak isimlendirilen protein fosfatazın treonin-14 ve tirozin-15'i defosforillemesi sonucunda, Cdk1/siklin B kompleksinin aktifleşmesi ile gerçekleşir.

Bu bölümde daha sonra tartışılacağı gibi, bir kere aktifleştikten sonra, Cdk1 protein kinaz, M evresinin olaylarını başlatan bir grup, farklı hedef proteini fosforile eder. Ayrıca, Cdk1 aktivitesi, siklin B'nin übikütin aracılığıyla proteoliz ile parçalanmasını tetikler. Siklin B'nin übikitinasyonu Anafaza



Şekil 17.12 MPF regülasyonu Cdk1, S ve G_2 süresince siklin B ile kompleksler oluşturur. Cdk1 daha sonra, aktivitesi için gerekli olan, treonin-161'de ve Cdk1 aktivitesini bastırmak için de tirozin-15'de (ve omurgalılarda treonin-14) fosforillenir. Thr14 ve Tyr15'in defosforilasyonu, G_2'den M'ye geçişte MPF'yi aktifleştirir. MPF aktivitesi daha sonra, mitozun sonuna doğru, siklin B'nin proteolitik olarak yıkılmasıyla sonlanır.

ilerleten kompleks/siklozom (*Anaphase promoting complex/cyclosome, APC/C*) olarak adlandırılan bir ubikütin ligaz enzimi aracılığıyla gerçekleşir. APC/C ise, Cdk1/siklin B tarafından fosforilasyonu sonucu aktive olur. Siklin B'nin proteolitik yıkımı Cdk1'i inaktive ederek, hücrenin mitozdan çıkmasını, sitokineze uğramasını ve tekrar interfaza dönmesini sağlar. İleriki bölümlerde detaylı olarak tartışılacağı gibi, APC/C übikitin ligaz, M evresi ve diğer evrelerde de, siklinleri ve bazı anahtar düzenleyici proteinleri proteolitik yıkıma uğratarak hücre döngüsünün ilerlemesinde önemli bir rol üstlenir.

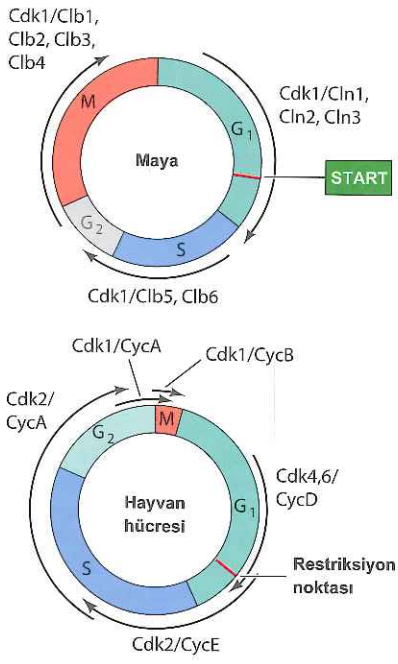
Animasyon 17.4
sites.sinauer.com/cooper7e/a17.4
Siklinler, Cdk'ler ve Hücre Döngüsü Siklin B ve Cdk1'den oluşan olgunlaşmayı ilerleten faktör (MPF), hücre döngüsünde G_2'den M evresine geçişi düzenler.

Siklin ve siklin-bağımlı kinaz aileleri

MPF'nin (Cdk1/siklin B) yapı ve fonksiyonu, sadece M evresine giriş ve çıkışın anlaşılması için moleküler temel sağlamakla kalmamış, aynı zamanda diğer hücre döngüsü geçişlerinin düzenlenmesinin anlaşılmasına temel oluşturmuştur. Cdk1/siklin B kompleksinin tanımlanmasıyla sağlanan ipuçları, hücre döngüsü denetiminin anlaşılması üzerinde güçlü bir etki oluşturmuştur. Örnek olarak, sonraki çalışmalar hem Cdk1'in hem de siklin B'nin, benzer proteinlerin oluşturduğu büyük ailelerin üyeleri olduklarını göstermiştir. Bu ailelerin farklı üyeleri, hücre döngüsünün farklı evrelerinin gelişimini kontrol etmektedir.

Daha önce tartışıldığı gibi, Cdk1, mayada hem START'dan geçişi hem de mitoza girişi kontrol eder. Ancak, bu işlevlerini farklı siklinlerle bir araya gelerek gerçekleştirir (**Şekil 17.13**). Örnek olarak, G_2'den M'ye geçiş, mitotik B-tipi siklinlerle (Clb1, Clb2, Clb3 ve Clb4) bağlanan Cdk1 tarafından gerçekleştirilir. Buna karşın, START'dan geçiş, **G_1 siklinler** (ya da **Cln**'ler) olarak adlandırılan farklı bir sınıf siklinlerle bağlanan, Cdk1 tarafından kontrol edilir. Cdk1 daha sonra, S evresinde ilerlemek için gerekli olan, farklı B-tipi siklinlerle (Clb5 ve Clb6) bağlanır. B-tipi ve G_1 siklinler ile olan bu bağlanmalar, Cdk1'i, hücre döngüsünün özgül evrelerinde ilerleme için gerekli olan, farklı substrat proteinleri fosfatlanması için yönlendirir.

Yüksek ökaryotların hücre döngüleri sadece çeşitli siklinler tarafından değil, aynı zamanda çeşitli Cdk1-benzeri protein kinazlar tarafından da kontrol edilir. Bu Cdk1-benzeri kinazlar **Cdk**'lar (siklin-bağımlı kinazlar) olarak bilinirler. Cdk ailesinin bu üyeleri, hücre döngüsünün farklı basamakları boyunca ilerlemeyi yönlendirmek için spesifik siklinlerle bağlanırlar (bkz. **Şekil 17.13**). Örneğin, G_1'den S'ye geçiş, temel olarak, siklin D ve E ile bağlanan Cdk2, Cdk4 ve Cdk6 tarafından düzenlenir. Cdk4 ve Cdk6'nın D-tipi siklinlerle (siklin D1, D2 ve D3) oluşturduğu kompleksler, G_1 restriksiyon noktasından geçişte kritik bir role sahiptir. E tipi siklinler (E1 ve E2), G_1'in ilerleyen evresinde ifade edilir ve Cdk2/siklin E kompleksleri G_1'den S'ye geçiş ve DNA sentezinin başlaması için gereklidirler. Cdk2'nin A tipi siklinler (A1 ve A2) ile yaptığı kompleksler, hücrelerin S evresinin sonlarından başlayarak ve G_2 evresi boyunca görev alırlar.



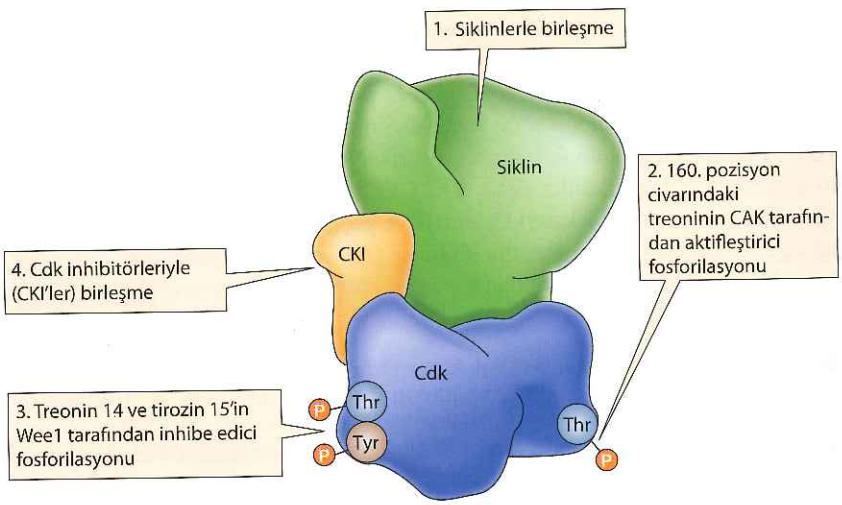
Şekil 17.13 Siklin ve siklin-bağımlı kinaz kompleksleri Mayada START geçişi G_1 siklinlere (Cln1, Cln2 ve Cln3) bağlanan Cdk1 ile denetlenir. Cdk1'in farklı B-tipi siklinlerle (Clb'ler) oluşturduğu kompleksler S evresinde ilerlemeyi ve mitoza girişi düzenler. Hayvan hücrelerinde, G_1 restriksiyon noktasında ilerleme, Cdk4 ve Cdk6'nın D-tipi siklinlerle yaptığı kompleksler tarafından denetlenir. Cdk2/siklin E kompleksi G_1'den S'ye geçiş için gereklidir. Daha sonra Cdk2/siklin A kompleksleri S ve G_2 evrelerinde ilerlemek için gereklidir. Cdk1/Siklin A ve Cdk1/Siklin B kompleksleri G_2'den M evresine geçişi ve mitozun ilerlemesini düzenlerler.

Mitozun başlatılması ve M evresinin aşamalarının sırasıyla geçilmesi, Cdk1'in A ve B tipi (B1, B2, B3) siklinlerle yaptığı kompleksler sayesinde yürütülür.

Farklı Cdk/siklin kompleksleri hücre döngüsünün farklı evrelerinde görev almalarına rağmen, genetiği değiştirilmiş farelerde yapılan Cdk ve siklin hakkındaki çalışmalar şaşırtıcı oranda bir esnekliği ortaya çıkarmıştır. Herhangi bir Cdk veya siklinin yokluğunu diğer Cdk ve siklinler telafi edebilmektedirler. En şaşırtıcı olan bulgu ise, hiçbir interfaz Cdk proteininin (Cdk2, Cdk4, Cdk6) bulunmadığı hücrelerin dahi hücre döngüsünü tamamlayarak çoğalabilmeleridir. Bu hücrelerin incelenmesiyle, diğer Cdk'lerin yokluğunda Cdk1'in tüm siklinlere bağlanabildiği ve hücre döngüsünün tüm evrelerinde ilerlemeyi düzenleyebildiği gözlemlenmiştir. Buna karşılık, Cdk1'in yokluğunda fare embriyoları gelişememektedirler. Dolayısıyla Cdk1, memeli hücrelerinde (mayalarda olduğu gibi) bulunması zorunlu olan tek Cdk'dir ve diğer Cdk'lerin yokluğunu telafi edebilmektedir.

Hücre döngüsü ilerlemesi sırasında, Cdk'ların aktivitesi en az dört moleküler mekanizma ile düzenlenir (**Şekil 17.14**). Cdk1 için daha önce tartışıldığı gibi, regülasyonun ilk aşaması Cdk'lerin, siklin ortaklarıyla bağlanmalarını içerir. Böylelikle, spesifik Cdk/siklin komplekslerinin oluşumu, siklin sentezi ve parçalanması yoluyla kontrol edilir. İkinci olarak, Cdk/siklin komplekslerinin aktivasyonu için, Cdk üzerindeki, 160'ıncı pozisyon yakınında bulunan korunmuş treonin amino asidinin fosforilasyonu gereklidir. Cdk'lerin bu aktive edici fosforillenmesi, CAK (Cdk-aktifleştiren kinaz) olarak adlandırılan ve Cdk (Cdk7)'nin siklin H ile kompleks oluşturmasıyla meydana gelen bir enzim tarafından katalizlenir. Cdk7 ve siklin H'nin kompleksi, RNA polimeraz II'nin transkripsiyonu başlatması için gerekli olan (bkz. Bölüm 8) transkripsiyon faktörü TFIIH ile de bağlanır. Cdk ailesinin bu üyesinin, hücre döngüsü regülasyonu yanı sıra, transkripsiyonda da yer aldığı anlaşılmaktadır.

CAK tarafından, aktive edici fosforillenmenin aksine, Cdk regülasyonunun üçüncü mekanizması, Weel protein kinaz tarafından katalizlenen, Cdk amino ucuna yakın tirozinlerin, inhibe edici fosforillenmesini kapsar. Örnek olarak,



Şekil 17.14 Cdk düzenlenme mekanizmaları Cdk'ların aktiviteleri dört moleküler mekanizma ile düzenlenir.

Tablo 17.1 Cdk İnhibitörleri

İnhibitör	Cdk veya Cdk/siklin kompleksi	İnhibe edilen hücre döngüsü aşaması
Ink4 ailesi (p15, p16, p18, p19)	Cdk4 ve Cdk6	G_1
Cip/Kip ailesi (p21, p27, p57)	Cdk2/siklin E	G_1
	Cdk2/siklin A	S, G_2

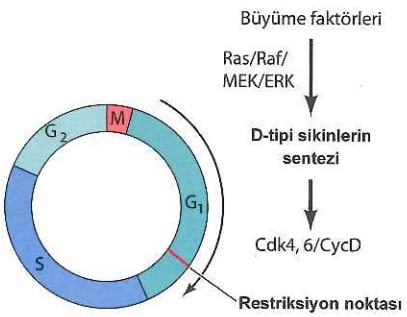
Cdk1 ve Cdk2'nin ikisi de, omurgalılarda tirozin-15 ve komşu treonin-14'ün fosforillenmesi ile inhibe edilir. Bu Cdk'ler daha sonra, Cdc25 protein fosfataz ailesinin üyeleri tarafından, bu amino asitlerin defosforillenmesiyle aktifleşirler.

Cdk'lerin fosforillenmesi yoluyla regülasyonuna ek olarak, aktiviteleri, inhibitör proteinlerin (**Cdk inhibitörleri** ya da **CKI**'ler olarak adlandırılır) Cdk/siklin komplekslerine bağlanması yoluyla da kontrol edilebilir. Memeli hücrelerinde, iki Cdk inhibitör ailesi, farklı Cdk/siklin komplekslerinin düzenlenmesinden sorumludur (**Tablo 17.1**). Ink4 ailesinin üyeleri özel olarak Cdk4 ve Cdk6'ya bağlanır ve inhibe ederler, yani Ink4 CKI'lar G_1'deki restriksiyon noktasından geçişi inhibe ederler. Buna karşın, Cip/Kip ailesinin üyeleri ise, Cdk ve siklinlere birlikte bağlanarak Cdk2/siklin A, ve E komplekslerini inhibe ederler, ve böylece S evresine girişi ve S ve G_2 evreleri boyunca ilerlemeyi engellerler. Dolayısıyla, Ink4 ve Cip/Kip proteinlerinin kontrolü, Cdk aktivitesinin düzenlenmesinde ek bir mekanizma sağlar. Çok sayıdaki Cdk denetim biçiminin birleşik etkileri, hem kontrol noktalarının kontrolüne, hem de hücre çoğalmasını düzenleyen ekstraselüler çeşitli uyarılara yanıt olarak, hücre döngüsü kontrolünden sorumludur.

Büyüme faktörleri ve G_1 Cdk'lerin regülasyonu

Daha önce tartışıldığı gibi, hayvan hücrelerinin çoğalması, çoğunlukla, G_1'in geç safhasındaki restriksiyon noktasından hücrelerin ilerlemesini kontrol eden, çeşitli ekstraselüler büyüme faktörü tarafından düzenlenir. Büyüme faktörlerinin yokluğunda, hücreler restriksiyon noktasını geçemezler ve durağan (quiescent) hale gelirler, çoğunlukla G_0 olarak bilinen dinlenme durumuna geçerler. Bu durumdan çıkmaları ve tekrar hücre döngüsüne girmeleri ancak büyüme faktörü uyarılarına cevaben gerçekleşir. Hücre döngüsü ilerlemesinin ekstraselüler büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmesi, büyüme faktörü reseptörlerinin (önceki bölümde tartışıldı) uyardığı hücre-içi sinyal yolaklarının, sonunda, hücre döngüsü mekanizmasının bileşenlerini denetlediği anlamına gelir.

Büyüme faktörü sinyal iletimi ve hücre döngüsünün işleyişi arasında önemli bir ilişki D-tipi siklinler ile sağlanmıştır (**Şekil 17.15**). Siklin D sentezi Ras/Raf/MEK/ERK yolağıyla iletilen büyüme faktörü uyarısına yanıt olarak başlar ve büyüme faktörlerinin varlığı süresince sentez devam eder. Ancak, siklin D çok çabuk parçalandığı için, büyüme faktörleri ortamdan çekildiğinde hücre-içi konsantrasyonları hızla azalır. Yani, G_1'de, büyüme faktörleri bulunduğu sürece Cdk4, 6/siklin D kompleksleri hücrelerin restriksiyon noktasından geçişini sağlar. Diğer yandan, eğer hücre döngüsünün bu kilit düzenlenme noktasından önce büyüme faktörleri ortamdan uzaklaşırsa, siklin D seviyeleri hızla düşer ve hücreler G_1'den S'ye geçemeyerek G_0'a girerler ve durağan hale gelirler. Siklin D1'in uyarılabilirliği ve hızlı dönüşüm özelliği, hücre döngüsü mekanizması ile büyüme faktörü sinyali arasında bağlantı kurar ve böylece,



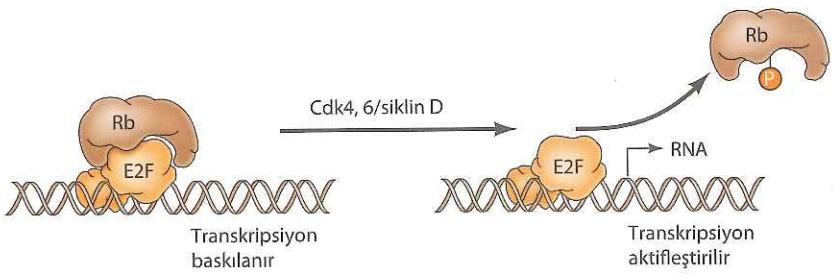
Şekil 17.15 D-tipi siklinlerin uyarılması Büyüme faktörleri, Ras / Raf / MEK / ERK sinyal yolağı aracılığıyla, D-tipi siklin sentezini uyararak, hücre döngüsünün G_1'deki restriksiyon noktasında ilerlemesini sağlar. (Bkz. Şekiller 16.28 ve 16.29)

ekstraselüler büyüme faktörlerinin, hücrelerin G_1'den ilerlemesini kontrol etmelerine olanak sağlar.

Siklin D1, büyüme faktörü sinyal iletiminin önemli hedeflerinden biri olduğundan, tahmin edilebileceği gibi, siklin D regülasyonundaki bozukluklar, kanser hücrelerinin karakteristik özelliği olan kontrolsüz çoğalmaya neden olur. Bu beklentiye uygun olarak, insan kanserlerinin çoğunun, hücre döngüsü regülasyonundaki bozukluklar sonucu, diğer büyük bir kısmının da büyüme faktörü reseptörleri tarafından aktive edilen hücre-içi sinyal yolaklarındaki anormalliklerden kaynaklandığı bulunmuştur (bkz. Bölüm 16). Örneğin, lenfomalar ve meme kanserleri de dahil birçok insan kanserinin gelişimine, siklin Dl'in sürekli, kontrol edilemeyen ekspresyonu ile sonuçlanan mutasyonlar katkıda bulunmaktadır. Benzer şekilde, Cdk4, 6/siklin D komplekslerine bağlanan Ink4 Cdk inhibitörlerini (örn., pl6) inaktive eden mutasyonlara da, insan kanser hücrelerinde sıklıkla rastlanmaktadır.

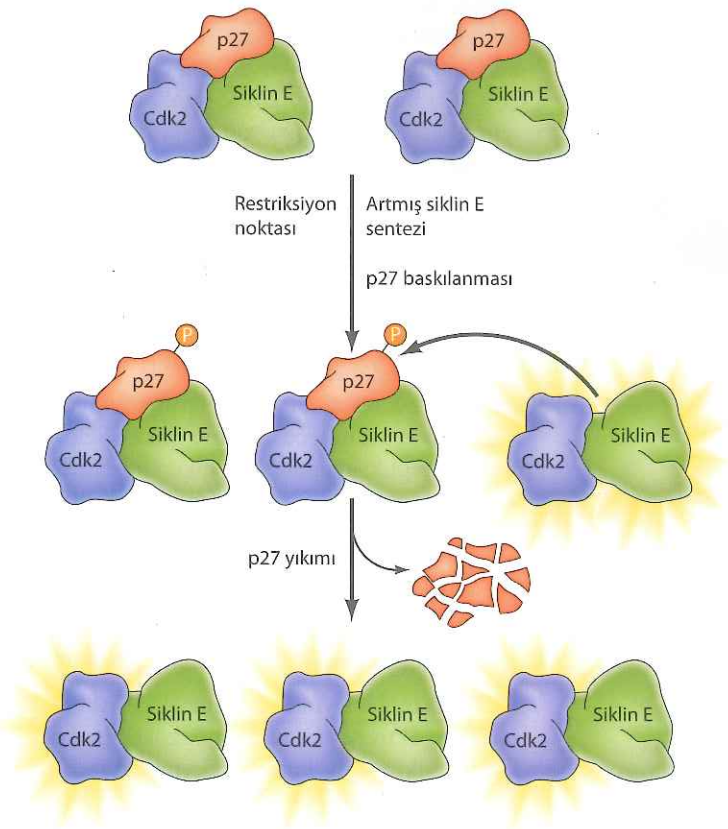
Siklin D, büyüme kontrolü ve kanser arasındaki bağlantıyı kuvvetlendiren diğer bir gerçek de, geniş çeşitlilikteki insan tümörlerinde, Cdk4, 6/siklin D1 komplekslerinin önemli bir substrat proteininin sıklıkla mutasyona uğramış olmasıdır. **Rb** olarak simgelenen bu protein, ilk kez, nadiren görünen çocukluk çağı göz tümörü olan retinoblastomdan sorumlu bir genin ürünü olarak tanımlanmıştır (bkz. Bölüm 19). Daha sonraki çalışmalar, fonksiyonel Rb protein eksikliğine yol açan mutasyonların, sadece retinoblastom ile sınırlı olmadığını, yaygın insan kanserlerinin çoğunda da rol oynadığını göstermiştir. *Rb*, inaktivasyonunun tümör gelişimine yol açtığı gen olan, **tümör baskılayıcı gen** için bir prototiptir. Ras (bkz. Bölüm 16) ve siklin D1 gibi onkogen proteinler hücre çoğalmasını desteklerken, tümör baskılayıcı genlerden kodlanan proteinler, hücre döngüsü ilerlemesini yavaşlatan fren rolü oynarlar. Tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan hücre döngüsü düzenleyicilerine verilebilecek diğer örnekler, Ink4 Cdk inhibitörleri ve bu bölümde daha önce tartışılan, önemli çoğalma düzenleyicisi p53'dür.

Rb ile ilgili daha sonraki çalışmalar, DNA sentezi ve hücre döngüsü ilerlemesi için gerekli genlerin ekspresyonu ile hücre döngüsü mekanizmasının eşleşmesi için Rb'nin anahtar rol oynadığını ortaya çıkarmıştır (**Şekil 17.16**). Hücreler döngüde ilerlerken, Rb'nin aktivitesi, fosforilasyonundaki



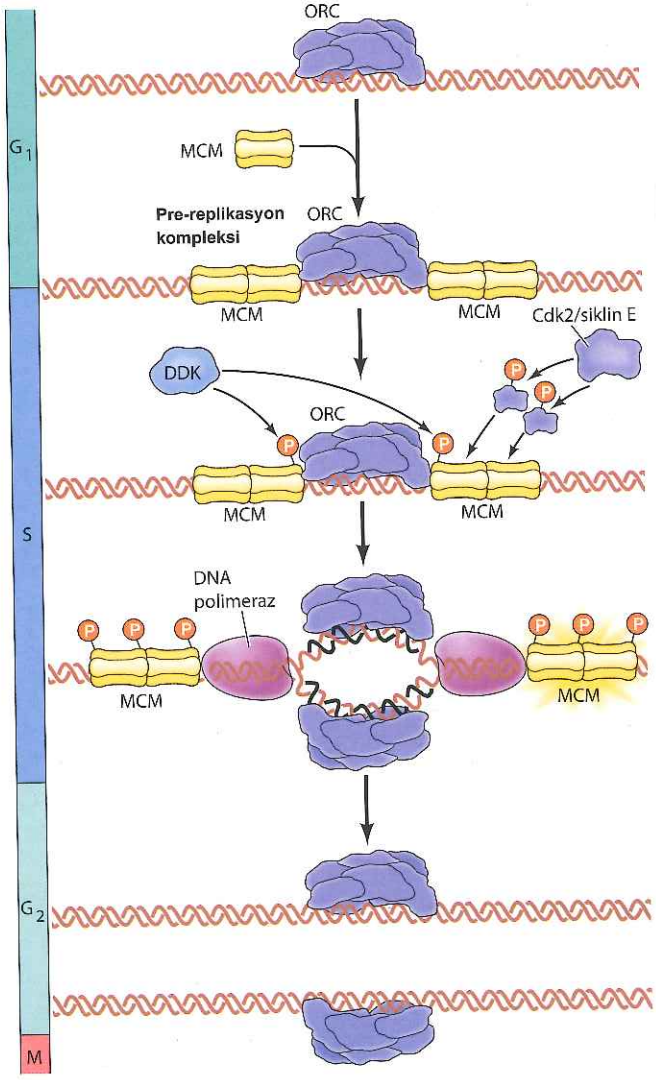
Şekil 17.16 Hücre döngüsünün Rb ve E2F ile düzenlenmesi Fosfatlanmamış durumdaki Rb, E2F tarafından kontrol edilen genlerin transkripsiyonunu baskılamak üzere, E2F ailesi üyelerine bağlanır. Rb'nin, G_1'in sonunda, Cdk4, 6/siklin D kompleksleri tarafından fosforillenmesi E2F'den ayrılmasına neden olur. Böylece, E2F, hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli proteinleri kodlayan hedef genlerinde ekspresyonu uyarır.

değişikliklerle denetlenir. Örnek olarak, hücre G_1'deki restriksiyon noktasından geçerken, Rb Cdk4, 6/siklin D kompleksleri tarafından fosfatlanır. Fosfat eklenmemiş formdaki (G_0 da ya da G_1'in erken safhasında bulunur) Rb, siklin E'yi kodlayan gen de dahil olmak üzere, hücre döngüsü ilerlemesinde yer alan birçok genin ekspresyonunu düzenleyen **E2F** transkripsiyon faktörleri ailesinin üyelerine bağlanır. E2F, Rb'nın varlığında ya da yokluğunda hedef dizilerine bağlanır. Ancak, Rb baskılayıcı rol oynar ve Rb/E2F kompleksi E2F tarafından kontrol edilen genlerin transkripsiyonunu engeller. Rb'nin Cdk4, 6/siklin D kompleksleri tarafından fosforillenmesi, E2F'den ayrılmasına neden olur ve böylece, E2F hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. Rb, bu yolla, hücre döngüsü ilerlemesinde gerekli genler üzerinde etkili olan E2F'nin, baskılayıcıdan aktivatöre dönüşünü sağlayan bir çeşit moleküler şalter gibi hareket eder. Rb'nin Cdk4, 6/siklin D fosfatlanması yoluyla kontrolü, gen ekspresyonundaki bu ciddi kontrol ile, büyüme faktörlerinin G_1'deki varlığını bağdaştırır.



Şekil 17.17 Cdk2/siklin E'nin aktivasyonu G_1 evresinde, Cdk2/siklin E kompleksleri Cdk inhibitörü p27 tarafından baskılanırlar. Restriksiyon noktasından geçiş, E2F'in aktivasyonu sayesinde siklin E'nin sentezlenmesini uyarır. Ayrıca, büyüme faktörleri sinyalleri p27'nin sentezlenmesini engeller. Cdk2 aktive oldukça, p27'yi fosforile ederek degredasyonu için işaretler. Sonuç olarak Cdk2/siklin E kompleksleri tam aktivitelerine ulaşırlar ve S evresine girilir.

Restriksiyon noktasının aşılması ve S evresine giriş Cdk2/siklin E komplekslerinin aktivasyonu aracılığıyla mümkündür (Şekil 17.17). Bu kısmen, Rb fosforilasyonunun ardından E2F tarafından uyarılan siklin E sentezi sonucunda gerçekleşir. Buna ek olarak, Cdk2/siklin E aktivitesi G_0 veya erken G_1 evrelerinde Cip/Kip protein ailesinin bir üyesi olan Cdk inhibitörü p27 tarafından kısıtlanır (bkz. Tablo 17.1). Hücreler G_1 evresinde ilerlerken p27 tarafından Cdk2 üzerine uygulanan bu kısıtlama farklı mekanizmalar tarafından kaldırılır. Birincil olarak, Ras/Raf/MEK/Erk ve PI-3 kinaz yolakları aracılığıyla iletilen büyüme faktörü sinyalleri, p27'nin transkripsiyonunu ve translasyonunu düşürür, böylece hücre içindeki p27 miktarı azalır. Ek olarak, artan siklin D transkripsiyonu p27'nin Cdk4, 6/siklin D komplekslerine bağlanarak Cdk2/siklin E komplekslerini serbest bırakmasına neden olur. Cdk2 aktif duruma geçtiğinde, p27'yi fosforile ederek ubikitinlenmesi ve yıkımına yol açar. Bu pozitif otoregülasyon Cdk2/siklin E komplekslerinin tam aktivasyonunu ve S evresinin başlatılmasını sağlar. APC/C ubikütin ligaz Cdk2 tarafından inhibe edildiği için, S ve G_2 evreleri boyunca siklin seviyeleri yüksek tutulur.



Şekil 17.18 DNA replikasyonunun başlatılması G_1 evresinde, MCM helikaz proteinleri ORC (orijin tanıma kompleksi) proteinleri ile birlikte replikasyon orijinlerine bağlanarak pre-replikasyon kompleksini oluştururlar. S evresinde, Cdk2/siklin E ve DDK protein kinazlar aracılığıyla DNA replikasyonu başlatılır. DDK, MCM proteinlerini fosforile ederken, Cdk2 ise komplekse sonradan bağlanan ve MCM'i aktive eden diğer bazı proteinleri fosforile eder. MCM'in aktivasyonu DNA replikasyonunu başlatır ve MCM proteinleri replikasyon çatalı ile orijinlerden uzaklaştırılır. Cdk'lerin S, G_2 ve M evreleri boyunca gösterdikleri yüksek kinaz aktivitesi, MCM proteinlerinin tekrar orijinlere bağlanmasına engel olur. Böylece, pre-replikasyon kompleksleri sadece G_1 evresinde yeniden oluşturulabilirler.

S evresi ve DNA replikasyonunun düzenlenmesi

Cdk2/siklin E kompleksleri, replikasyon orijinlerinde (başlama noktası) DNA sentezini aktive ederek S evresini başlatırlar. Bölüm 7'de anlatıldığı gibi, memeli hücrelerinin DNA'larını kopyalamak için kullandıkları binlerce orijinin (bkz. Şekil 7.13) her birinde replikasyonun çok dikkatle denetlenmesi ve hücre döngüsünün S evresinde genom segmentlerinin sadece tek bir defa kopyalanmasının sağlanması gerekir. Yani, DNA, S evresinde replike olduğunda, hücre mitozu tamamlayıp hücre döngüsü bitinceye kadar, DNA replikasyonunun yeniden tetiklenmesine engel olacak kontrol mekanizmaları mevcuttur.

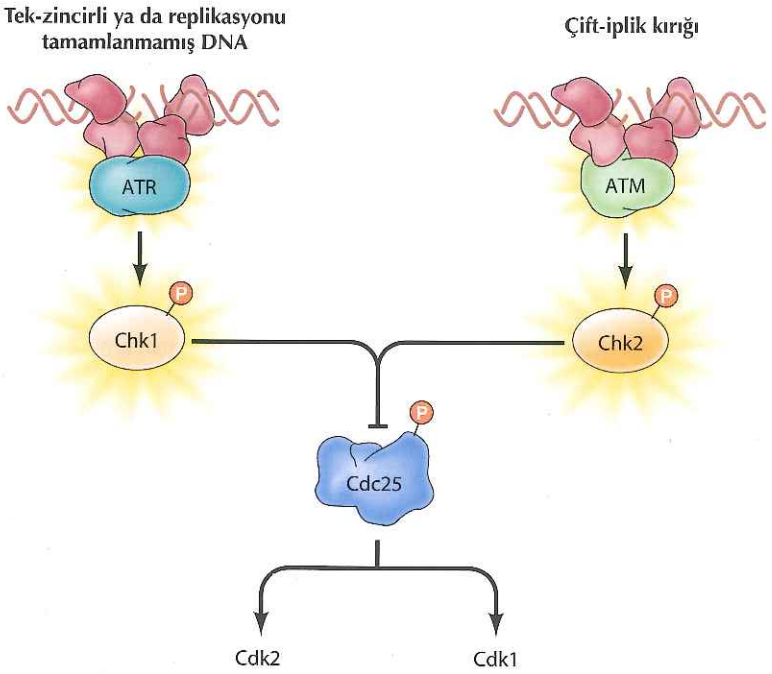
DNA replikasyonunu başlatan MCM helikaz proteinlerinin aktiviteleri, hücre döngüsünün farklı aşamalarında siklin/Cdk komplekslerince düzenlenir (Şekil 17.18). MCM helikaz proteinleri, G_1 evresinde orijin tanıma kompleksi (ORC) proteinleri ile birlikte replikasyon orijinlerine tutunurlar (bkz. Şekil 7.15). G_1 evresi boyunca pre-replikasyon kompleksi olarak inaktif kalırlar ve ancak hücreler S evresine girdiklerinde aktive olurlar. MCM'in S evresinde aktive olmasının nedeni, Cdk2/siklin E'nin pre-replikasyon kompleksine bağlanan çeşitli aktive edici proteinleri fosforile etmesi sonucudur. Daha önce açıklanmış olduğu gibi,

Cdk2/siklin E'nin aktivasyonu APC/C übikitin ligazın inhibisyonuna neden olur. APC/C'nin inhibisyonu, MCM proteinlerini doğrudan fosforile eden ikinci bir protein kinazın, DDK, aktivasyonuna neden olur. MCM helikazın aktive olması DNA replikasyonunun başlamasına ve MCM proteinlerinin replikasyon çatalı ile orijinden uzaklaştırılmasına neden olur. Cdk'lerin S, G_2 ve M evreleri boyunca yüksek aktiviteye sahip olmaları, MCM proteinlerinin replikasyon orijinlerine yeniden bağlanmalarını engeller. Dolayısıyla, pre-replikasyon kompleksleri ancak G_1'de, Cdk aktivitesi düşükken yeniden oluşabilirler. Bu nedenle, bir orijin S evresinde aktif hale gelirse, hücre mitoz bölünmeyi tamamlayıp bir sonraki hücre döngüsünün G_1 evresine girmedikçe, yeniden replikasyonu başlatamaz.

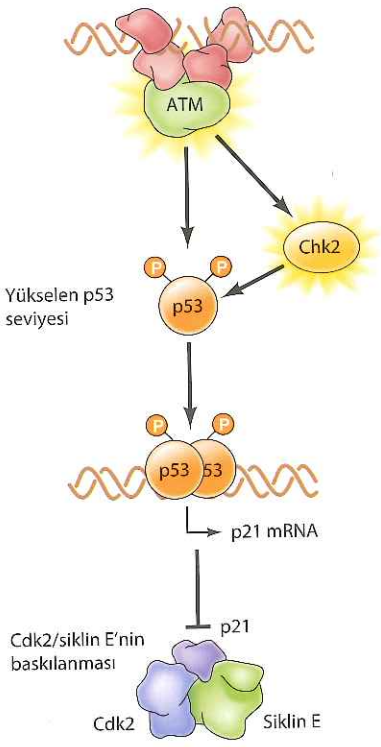
DNA hasarı kontrol noktaları

Hücre çoğalması büyüme faktörleri tarafından düzenlendiği gibi hücre döngüsünün ilerlemesini engelleyen bir takım sinyaller ile de kontrol edilir. DNA hasarı kontrol noktaları, hasar görmüş veya eksik olarak kopyalanmış DNA'yı tanıyarak hücre döngüsünün ilerlemesini duraksatırlar, böylece genomun bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynarlar. G_1, S ve G_2 evrelerinde işlev gören bu kontrol noktaları, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesine geçmeden önce hasarın tamiri için zaman sağlarlar (bkz. **Şekil 17.7**).

DNA hasarı oluştuğunda, birbiriyle akraba olan **ATR** ve **ATM** adlı iki protein kinaz aracılığıyla hücre döngüsü duraksatılır. ATR ve ATM'nin uyardığı sinyal iletim yolağı hücre döngüsünü duraksatmakla birlikte, DNA tamirinin başlatılmasına ve bazı durumlarda programlı hücre ölümüne sebep olur. ATR ve ATM tarafından DNA hasarının tanınmasının önemi, bu genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan, sinir ve bağışıklık sistemlerinde sorunlara yol açan *ataxia telangiectasia* hastalığından da anlaşılabilir. Etkilenen bireyler de kanser görülme sıklığı da oldukça yüksektir.



Şekil 17.19 Hücre döngüsünün DNA hasarı kontrol noktalarında durdurulması DNA hasarını tanıyan protein kompleksleri içinde yer alan ATM ve ATR protein kinazlar aktive edilir. ATR, tek-zincirli ya da henüz replikasyonu tamamlanmamış DNA tarafından, ATM ise genellikle çift iplik kırıkları tarafından aktive edilir. ATR ve ATM, daha sonra Chk1 ve Chk2 (sırasıyla) protein kinazları fosforile ederek aktive ederler. Chk1 ve Chk2, Cdc25 protein fosfatazları fosforile ederek baskılarlar. Cdc25 fosfatazlar, Cdk1 ve Cdk2'nin aktivasyonu için gerekli olduklarından, baskılanmaları G_1, S ve G_2 evrelerinde DNA hasarı kontrol noktalarında hücre döngüsünün durmasına neden olur.



Şekil 17.20 Hücre döngüsünü duraksatmada p53'ün rolü Memeli hücrelerinin DNA hasarı kontrol noktasında hücre döngüsünün duraksatılmasında p53 proteini önemli bir role sahiptir. ATM ve Chk2 tarafından fosforilasyonu p53'ü stabilize ederek, DNA hasarına yanıt olarak p53'ün hücre içindeki seviyesinin hızla artmasını sağlar. Bundan sonra, p53 proteini Cdk baskılayıcısı p21 proteinini kodlayan genin transkripsiyonunu aktive ederek, Cdk2/siklin E ve siklin A komplekslerinin baskılanmasına ve hücre döngüsünün durdurulmasına yol açar.

ATR ve ATM'nin her ikisi de, hasarlı veya replike olmamış DNA'yı tanıyan protein komplekslerinin parçasıdır (Şekil 17.19). ATM, DNA'da çift şerit kırıkları sonucu uyarılırken, ATR, tek şeritli ya da henüz replike olmamış DNA'yı tanıyarak aktive olur. DNA hasarı sonucu bir kez aktifleşen ATR ve ATM sırasıyla Chk2 ve Chkl **kontrol noktası kinazlarını** fosforile ederek aktive ederler. Bu kez de Chkl ve Chk2, Cdc25 fosfatazları fosfatlayarak inhibe olmalarını ya da yıkımlarını sağlayarak, hücre döngüsünü duraksatırlar. Cdc25 fosfatazlar, Cdk1 ve Cdk2 üzerindeki kısıtlayıcı fosforilasyonları kaldırarak (bkz. Şekil 17.14) hücre döngüsünün ilerleyebilmesi için gereklidirler. Dolayısıyla, DNA hasarı Cdk2'yi kısıtlayarak G_1 ve S evrelerinde hücre döngüsünü duraksatırken, ek olarak Cdk1'i kısıtlayarak G_2'de duraksamaya sebep olur.

Memeli hücrelerinde G_1 kontrol noktasındaki duraksama, Chk2 ve ATM tarafından fosforillenen, **p53** olarak bilinen diğer bir proteinin etkisi ile gelişir (Şekil 17.20). Fosforillenme, aksi halde süratle yıkılacak olan p53'ü, kararlı hale getirir ve DNA hasarı p53 miktarında hızlı artışa neden olur. p53 proteini bir transkripsiyon faktörüdür ve ekspresyon artışı, Cip/Kip ailesinden Cdk kısıtlayıcısı p21 geninin uyarılmasına yol açar. P21 proteini Cdk2'nin siklin E veya siklin A komplekslerini inhibe ederek hücre döngüsünün duraksamasına sebep olur (bkz. Tablo 17.1)

İlginçtir ki, insan kanserlerinde p53'ü kodlayan gen sıklıkla mutasyona uğramış durumdadır. Bu mutasyonlarla p53 işlev kaybı, hasarlı DNA'ya yanıt olarak G_1'de duraksamayı engeller ve hasarlı DNA replike olarak onarılmadan yavru hücrelere geçer. Hasarlı DNA'ların kalıtımı, mutasyon sıklığında artışa ve genel bir genom kararsızlığına neden olur, bu da kanser gelişimine katkıda bulunur. p53 genindeki mutasyonlar insan kanserlerinde en yaygın genetik değişikliktir (bkz. Bölüm 19). Bu durum, hücre döngüsü düzenlenmesinin çok hücreli organizmaların hayatında ne kadar kritik bir öneme sahip olduğunun göstergesidir.

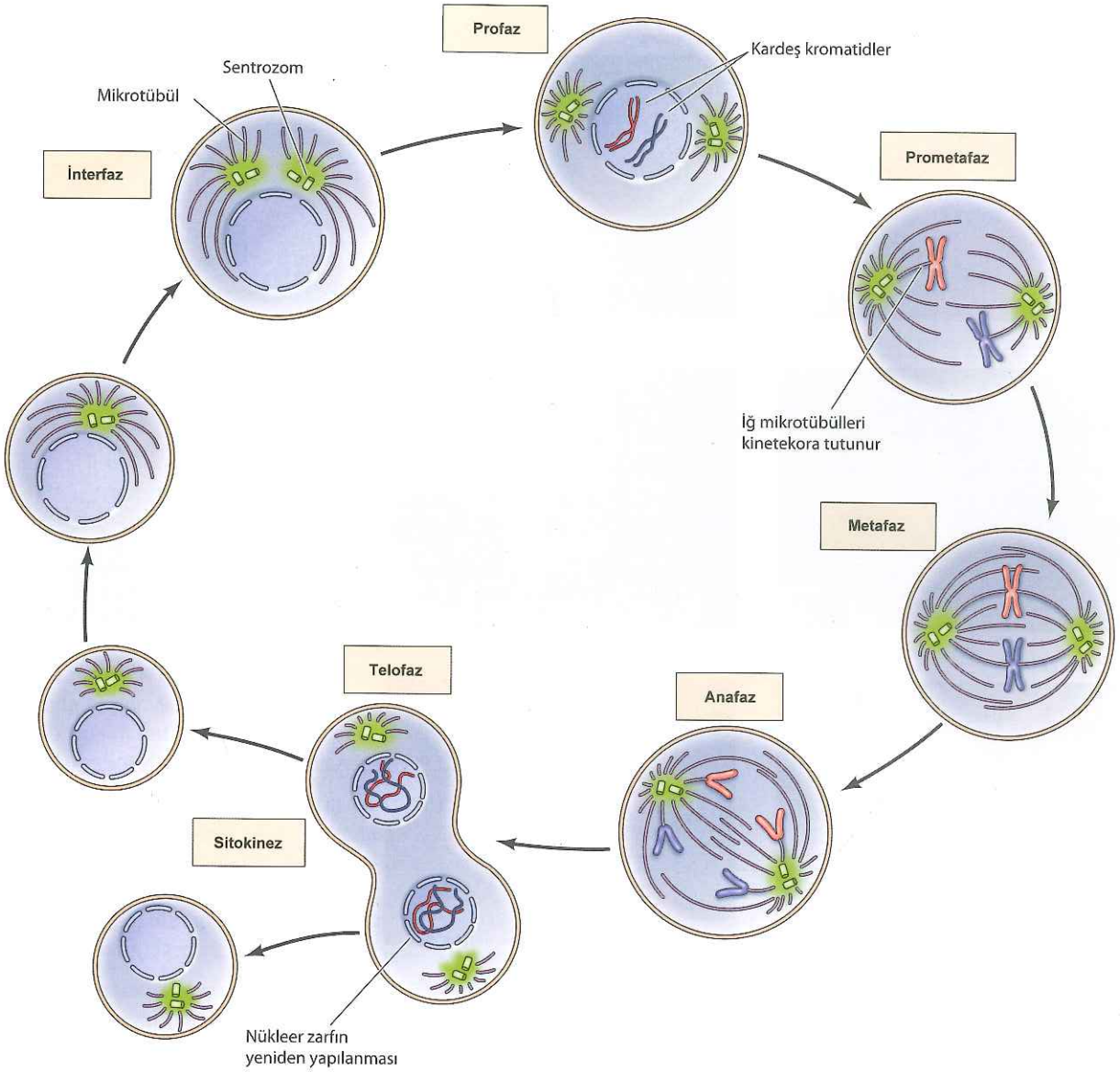
Animasyon 17.5
sites.sinauer.com/cooper7e/a17.5
Bir Hayvan Hücresinde Mitoz Bölünme Mitoz hücre çekirdeğinin bölünmesidir. Dört evreden oluşur –profaz, metafaz, anafaz, ve telofaz– ve bunu takiben sitokinez olarak adlandırılan sitoplazmanın bölünmesi gerçekleşir.

M Evresi Olayları

M evresi, hücre döngüsünün, tüm hücre içeriğinin en geniş yeniden düzenlenmesini gerektiren en etkileyici evresidir. Mitoz (çekirdek bölünmesi) esnasında, kromozomlar yoğunlaşır, hücrelerin çoğunda nükleer zar yıkılır, mitotik iğleri oluşturmak üzere hücre iskeleti yeniden düzenlenir ve kromozomlar zıt kutuplara doğru hareket eder. Kromozomların ayrılmasını, genellikle, hücre bölünmesi (sitokinez) izler. Bu olayların çoğu daha önceki bölümlerde, nükleus ve hücre iskeleti yapı ve fonksiyonu açısından, tartışılmış olmakla birlikte, burada M evresi ile MPF'nin (Cdk1/siklin B) ilişkileri bağlamında yeniden gözden geçirilecektir.

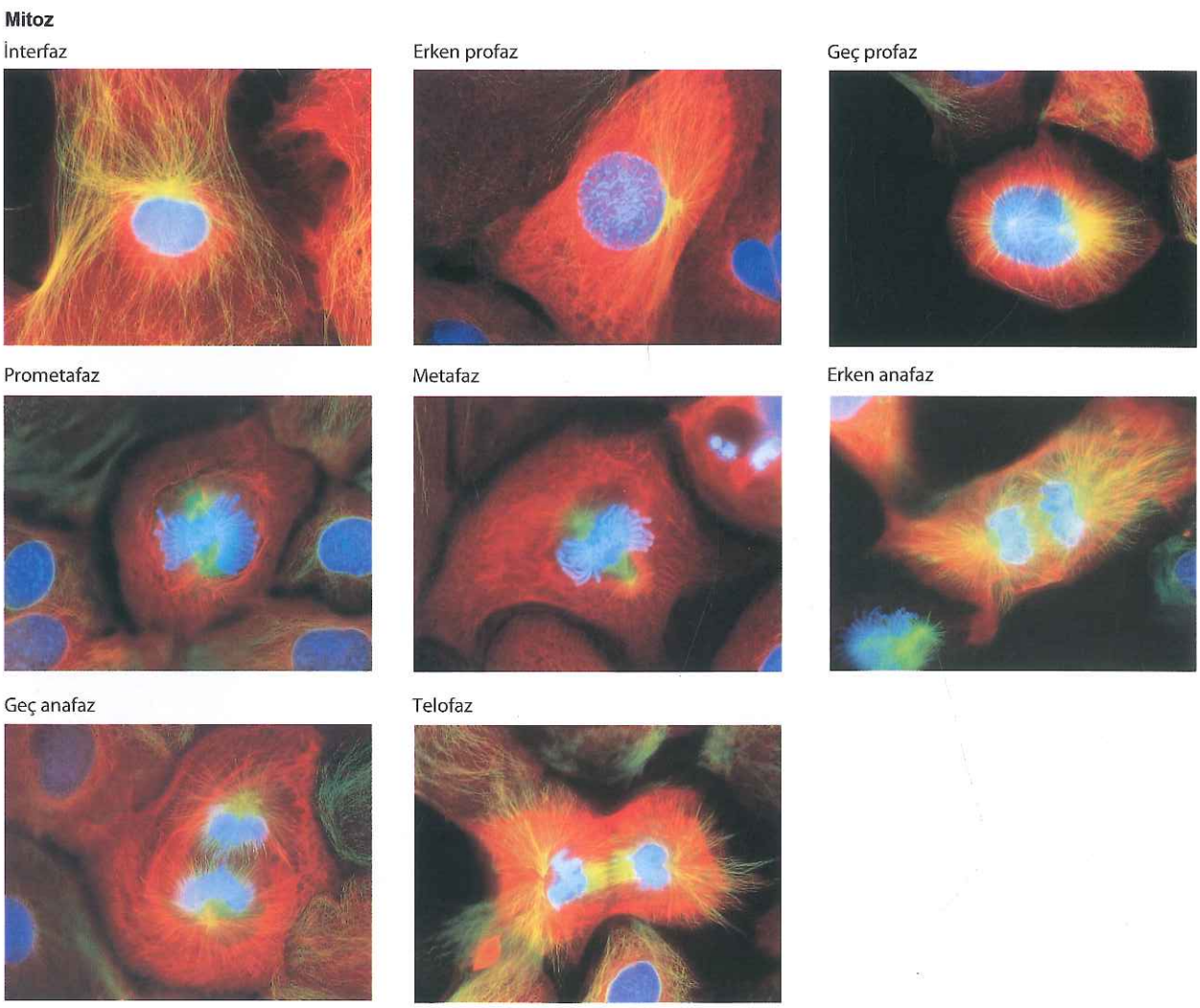
Mitozun aşamaları

Mitozun detaylarının çoğu, farklı organizmalar arasında değişiklik gösterse de,



Şekil 17.21 Hayvan hücresinde mitoz aşamaları Profaz sırasında, kromozomlar yoğunlaşır ve sentrozomlar mitotik iğin oluşumunu başlatmak üzere, nükleusun zıt yönlerine hareket eder. Daha sonra, çekirdek zarfının yıkılması ile, iğ mikrotübülleri kromozomların kinetokorlarına tutunabilir. Prometafaz sırasında, kromozomlar, sentrozomlar ile hücre merkezi arasında gidip gelir ve sonunda iğin ortasına dizilirler (metafaz). Anafazda, kardeş kromatidler ayrılarak, iğin zıt kutuplarına doğru hareket ederler. Mitoz, daha sonra telofazda, nükleer zarfın yeniden oluşması ve kromozomların yoğunluk kaybetmesiyle sonlanır ve sitokinez ile, interfazda iki yavru hücre elde edilir. Her yavru hücrenin tek bir sentrozom aldığına dikkat ediniz. Sentrozom, bir sonraki mitoz öncesinde ikilenir.

Video 17.3
sites.sinauer.com/cooper7e/v17.3
Mitoz Hücre döngüsünün en çarpıcı evresi olan mitozda, kardeş kromozomlar ayrılır ve hücreler bölünür.

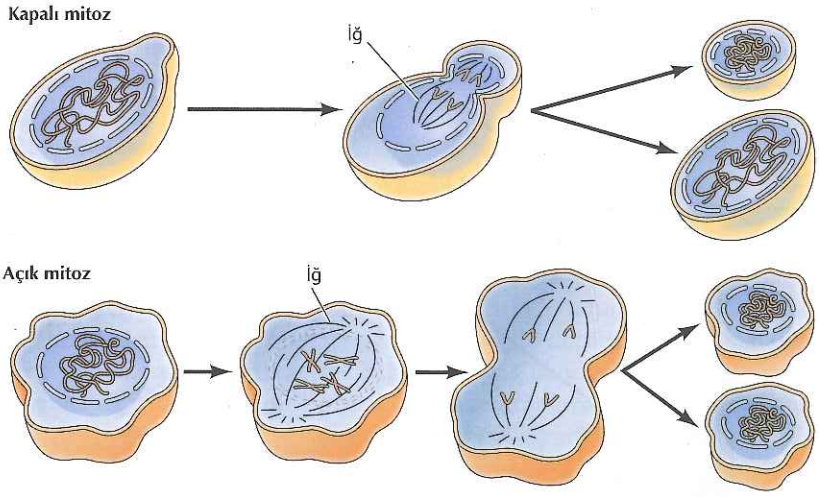


Şekil 17.22 Su kertenkelesinin akciğer hücrelerinde, mitoz sürecinde, kromatin, keratin ve mikrotübüllerin floresans mikroskop görüntüleri Kromatin mavi, keratin kırmızı ve mikrotübüller yeşil/sarı boyanmış.

Video 17.4
sites.sinauer.com/cooper7e/v17.4
Mitozun Floresan Proteinlerle Gözlemlenmesi Mitoz sırasında, kromozomlar yoğunlaşır, nükleer zarf yıkılır, sitoskeleton mitotik iği oluşturur ve kromozomlar karşı kutuplara ayrılırlar.

kardeş kromatidlerin güvenilir şekilde ayrılmalarını sağlayan temel süreç tüm ökaryotlarda korunmuştur. Mitozun bu temel olayları, kromozom yoğunlaşmasını, mitotik iğin oluşumunu ve kromozomların iğ mikrotübüllerine tutunmasını kapsar. Kardeş kromatidler, daha sonra birbirinden ayrılır ve iğin zıt kutuplarına hareket ederler, bunu, yavru nükleusların oluşumu izler.

Mitoz geleneksel olarak dört evreye ayrılır –**profaz**, **metafaz**, **anafaz** ve **telofaz**– bunlar, hayvan hücresi için **Şekil 17.21** ve **17.22**'de resimlenmiştir. Profaz, her biri iki kardeş kromatidden (S evresinde üretilmiş olan yavru DNA molekülleri) oluşan kromozomların yoğunlaşmasıyla başlar. Bu yeni replike olmuş DNA molekülleri S ve G_2 boyunca birbirine dolanmış durumdadır, kromatin yoğunlaşması sürecinde çözülürler. Yoğunlaşan kardeş kromatidler **sentromer** bölgesinde (Bölüm 6'da tartışıldığı gibi) bir arada tutulur. Sentromer, iğ mikrotübüllerinin bağlanma bölgesi olan **kinetokoru** oluşturmak



Şekil 17.23 Kapalı ve açık mitoz Kapalı mitozda, kromozomlar nükleus içerisinde iğin karşıt kutuplarına hareket ederken, nükleer zarf bozulmamış olarak kalır, ve sonra ikiye bölünür. Açık mitozda ise, nükleer zarf önce yıkılır ve ayrılmış olan kromozom gruplarının etrafında daha sonra yeniden oluşur.

üzere proteinlerin bağlandıkları bir DNA dizisidir. Kromozom yoğunlaşması dışında, **mitotik iğ**in oluşmasını sağlayan sitoplazmik değişiklikler de profaz sırasında başlar. **Sentrozomlar** (interfazda çiftlenmiş olan) birbirinden ayrılır ve nükleusun zıt yanlarına hareket ederler. Profazın sonunda oluşmaya başlayan mitotik iğ'in iki kutbu olarak görev yaparlar.

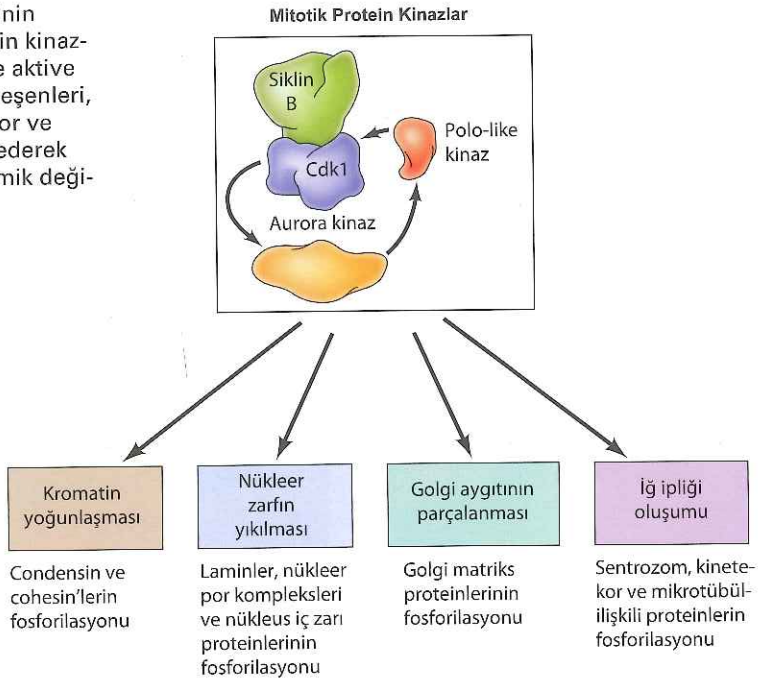
Yüksek ökaryotlarda, profazın sonunda nükleus zarfı yıkılır. Ancak, nükleer zarfın yıkılması mitozun genel özelliği değildir ve tüm hücrelerde gözlemlenmez. Örnek olarak, mayalar ve diğer birçok tek hücreli ökaryotlarda, nükleer zarfın bütün olarak kaldığı 'kapalı mitoz' görülür (Şekil 17.23). Bu hücrelerde iğin kutup cisimleri nükleer zarfın içinde gömülüdür ve yavru kromozomların, iğin zıt kutuplarına göçünden sonra, nükleus ikiye bölünür.

Profazın tamamlanmasından sonra, hücre, profaz ile metafaz arasında bir geçiş dönemi olan **prometafaza** girer. Prometafaz sırasında, mitotik iğin mikrotübülleri, yoğunlaşmış kromozomların kinetokorlarına tutunur. Kardeş kromatidlerin kinetokorları, kromozomun aksi yönlerinde yer alır ve böylelikle iğin zıt kutuplarından çıkan mikrotübüllere bağlanırlar. Kromozomlar, son olarak iğin merkezindeki metafaz yörüngesine dizilinceye kadar, ileri geri yer değiştirirler. Bu evrede hücre metafaza ulaşmış olur (bkz. Şekil 17.21).

Hücrelerin çoğu, anafaza girmeden önce metafazda sadece kısa bir süre için kalırlar. Metafazdan anafaza geçiş, birbirinden ayrılıp iğin zıt kutuplarına hareket edecek olan kardeş kromatidler arasındaki bağın kırılmasıyla tetiklenir. Mitoz, nükleusların yeniden oluştuğu ve kromozomların yoğunluğunun kaybolduğu, telofaz ile sonlanır. Sitokinez, genellikle geç anafaz esnasında başlar ve iki yavru interfaz hücresi oluşturmak üzere, telofazın sonunda tamamlanır.

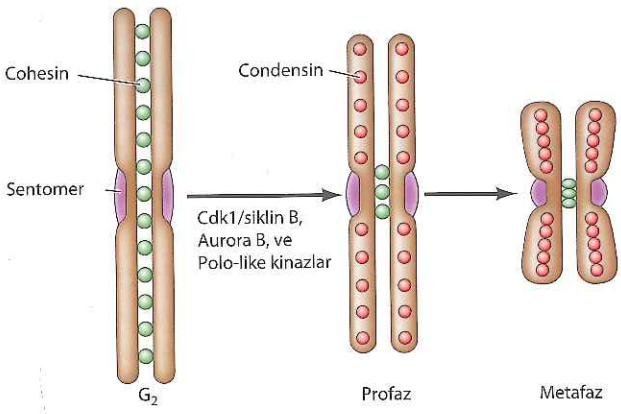
Mitoza giriş

Mitoz, hücrenin bir çok bileşeninde, hücrenin yapısal bütününün yeniden organizasyonuna yol açacak kadar dramatik değişiklikler gerektirir. Bu



Şekil 17.24 Mitotik protein kinazlar M evresinin başlangıcında, Cdk1, Aurora ve Polo-like protein kinazlar, bir pozitif geri besleme döngüsü sayesinde aktive edilirler. Condensin, cohesin, nükleer zarfın bileşenleri, golgi matrisi proteinleri ve sentrozom, kinetekor ve mikrotübüllerle bağlantılı proteinleri fosforile ederek mitoz sırasında çok sayıda nükleer ve sitoplazmik değişikliği uyarırlar.

bölümde daha önce tartışıldığı gibi, bu olaylar Cdk1/siklin B protein kinazın (MPF) aktivasyonu ile başlatılır. Cdk1/siklin B sadece, M evresi geçişinin ana düzenleyicisi olarak, ileri aşamalardaki diğer protein kinazları fosfatlayıp aktive ederek rol oynamaz, aynı zamanda hücresel yeniden yapılanmada görev alan yapısal proteinlerin bazılarını da direkt olarak fosforile eder (**Şekil 17.24**). Özellikle, **Aurora kinaz** (Aurora A ve Aurora B) ve **Polo-like kinaz** ailelerinden protein kinazlar Cdk1 tarafından koordineli olarak aktive edilerek M evresine giriş başlatılır. Aurora ve Polo-like kinazlar Cdk1 ile pozitif geribesleme döngüsü prensiplerine göre etkileşim gösterir. Cdk1, Aurora kinazları; Aurora kinazlar Polo-like kinazları; Polo-like kinazlar da Cdk1'i aktive ederler. Tüm bu proteinler mitoz sırasında çoklu işlevlere sahiptirler.

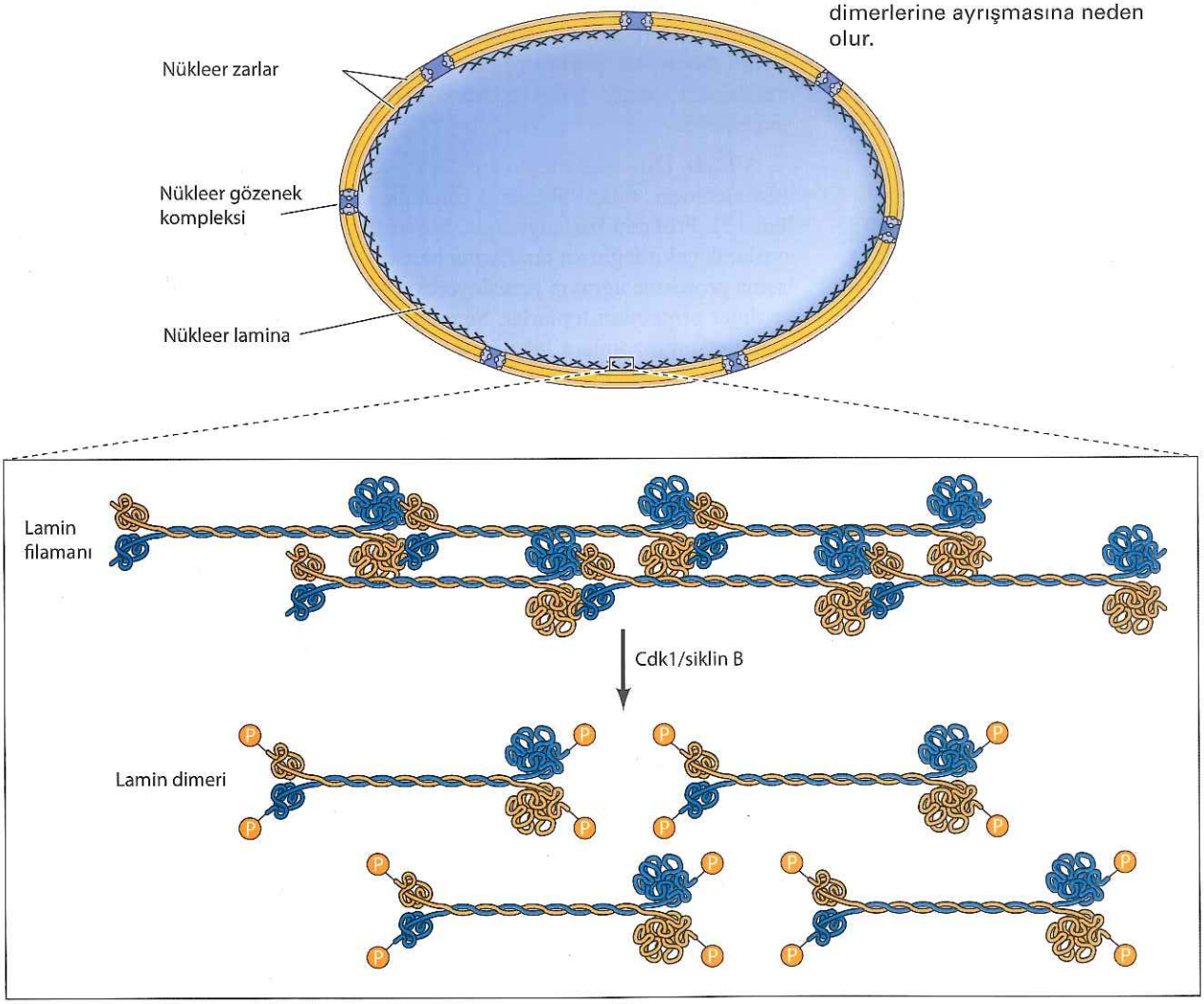


Şekil 17.25 Cohesin'lerin ve condensin'lerin aktivasyonu Cohesin'ler S evresi boyunca DNA'ya bağlanarak, replikasyondan sonra S ve G_2 evrelerinde kardeş kromatidler arasındaki bağlantıyı korurlar. Hücre M evresine girerken, condensin'ler Aurora B ve Cdk1 kinazlarca, cohesin'ler ise Auora B ve Polo-like kinazlarca fosforile edilirler. Condensin'ler sentromerler haricinde kromozom boyunca cohesin'lerin yerini alırlar ve kromatinin yoğunlaşmasını sağlarlar.

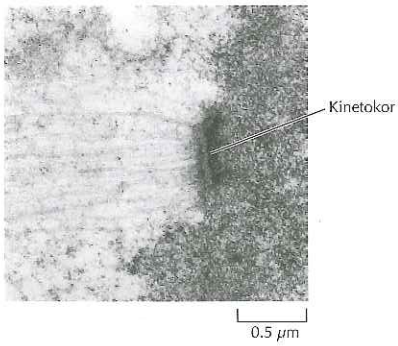
İnterfaz kromatininin yoğunlaşarak, mitotik hücrelerdeki sıkıca paketlenmiş kromozomları oluşturması, mitozun anahtar olayıdır. Bu olay, kromozomların birbirine dolaşmadan ya da kırılmadan mitotik iğ boyunca hareket edebilmelerine olanak sağlaması açısından önemlidir. Bölüm 6'da tartışıldığı gibi, interfaz nükleusunun içindeki kromatin, metafaz kromozomlarını oluşturmak üzere, yaklaşık bin kat yoğunlaşır. Bu kadar yoğunlaşmış kromatinin transkripsiyonu mümkün değildir, bu nedenle, kromatin yoğunlaşması gerçekleştiğinde transkripsiyon durur. Bu olayın temel önemine rağmen, metafaz kromozomlarının yapısını ya da kromatin yoğunlaşmasının moleküler mekanizmasını henüz tam olarak anlayabilmiş değiliz. Ancak, kromatin yoğunlaşmasının, ***condensin*** olarak

adlandırılan ve SMC (*structural maintenance of chromatin*: kromatinin yapısal korunması) protein ailesinin üyelerini kapsayan protein kompleksleri tarafından yürütüldüğü saptanmıştır.

Condensinler ve diğer bir SMC protein ailesinin üyesi **cohesinler** mitoz bölünme sırasında kromozomların ayrışmasına katkıda bulunurlar (Şekil 17.25). Cohesinler S evresinde DNA'ya bağlanırlar ve replikasyondan sonra kardeş kromatidler arasındaki bağlantıyı korurlar. Condensinler direkt olarak, hücreler mitoza girdiğinde condensinleri aktifleştirerek kromatin yoğunlaşmasını uyaran, Cdk1ve Aurora B protein kinazlar tarafından fosforillenirler. Bundan sonra condesinler, kardeş kromatidler boyunca ve sentromer haricindeki bölgelerde cohesinlerin (Aurora B ve Polo-like kinaz tarafından fosforile olurlar) yerini alırlar. Böylece kardeş kromatidler sadece sentrozomlarda birbirlerine bağlı kalırlar. Condensinler aynı zamanda kromatin yoğunlaşmasına yol açarak metafaz kromozomlarının oluşmasını sağlarlar. Aurora B kinaz tarafından histon H3 serin-10 fosforilasyonu da mitotik kromozomların yoğunlaşmasında önemli bir rol oynar.



Şekil 17.26 Nükleer zarfın yıkılması Cdk1/ siklin B, nükleer laminleri, nükleer gözenek kompleksini oluşturan proteinleri ve iç nükleer membran proteinlerini fosforile eder. Laminlerin fosforilasyonu, nükleer laminayı oluşturan lamin filamanlarının bağımsız lamin dimerlerine ayrışmasına neden olur.



Şekil 17.27 Kromozomun kinetokoruna tutunmuş mikrotübüllerin elektron mikroskop görüntüsü

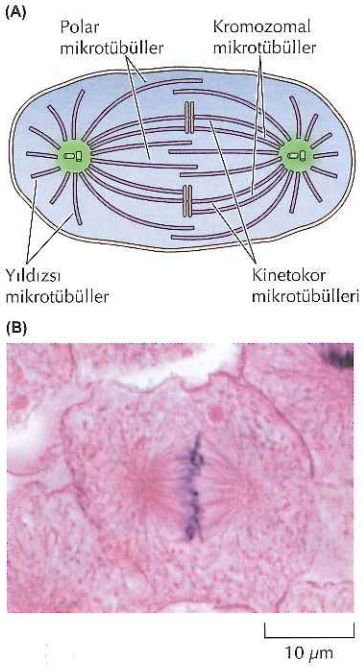
Mitozun en önemli olaylarından birisi olan nükleer zarfın yıkımı, tüm bileşenlerinde değişiklikleri içerir: Nükleer zar parçalara ayrılır, nükleer gözenek kompleksleri ayrışır, ve nükleer lamina depolimerize olur. Cdk1/siklin B, laminleri fosforile ederek, doğrudan, nükleer laminanın (nükleer membranın altındaki filamanlardan oluşan ağ örgüsü) depolimerizasyonuna yol açar (Şekil 17.26). Fosforilasyon, lamin filamanların yıkılmasına ve lamin dimerlerine yıkılmasına ve nükleer laminanın depolimerizasyonuna yol açar. Cdk1, aynı zamanda iç nükleer membranı ve nükleer gözenek kompleksindeki bazı proteinlerini fosforile ederek nükleer gözenek kompleksinin parçalara ayrılmasına ve iç nükleer membranın laminlerden ve kromatinden ayrılmasına sebep olur. Hayvan hücrelerinde, nükleer membranın entegre proteinleri, endoplazmik retikuluma abzorbe olurlar. Endoplazmik retikulum bozulmamış bir ağ olarak kalır ve mitoz bölünme sonucunda oluşan kardeş hücrelere paylaştırılır.

Golgi aygıtı, mitoz sırasında küçük veziküllere ayrıştırılır. Bunlar endoplazmik retikulum tarafından abzorbe olurlar ya da sitokines sırasında kardeş hücrelere paylaştırılırlar. Golginin veziküllere ayrıştırılması, Cdk1 aracılığıyla çeşitli golgi matrisi proteinlerinin fosforilasyonu aracılığıyla gerçekleşir.

Mitotik iğin oluşumuyla en son noktaya erişen, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, mikrotübüllerin dinamik kararsızlığının sonucudur (bkz. Bölüm 13). Profazın başlangıcında, S evresinde kopyalanmış olan sentrozomlar ayrılarak çekirdeğin zıt taraflarına hareket ederler. Ayrılmadan önce bir olgunlaşma prosesine uğrayıp genişleyerek iğ kurulumu için gerekli olan γ-tubulin ve diğer proteinleri toplarlar. Sentrozomun olgunlaşması, ayrılması ve iğ kurulumu, sentrozomlara lokalize olan Aurora A ve Polo-like kinaz tarafından yürütülür. Mikrotübüllerin devir oranı mitoz sırasında beş-on kat arasında artarak interfaz mikrotübüllerinin depolimerizazyonunu ve küçülmesini sağlar. Bu hızlanmış devir oranının, miktotübül ilişkili proteinlerin Cdk1, Aurora A ve Polo-like kinaz gibi mitotik kinazlar tarafından fosforilasyonu sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Sentrozomlardan doğan mikrotübüllerin sayısı da artarak, interfaz mikrotübüllerinin yerini çok sayıda olan ve sentrozomlardan çıkan mikrotübüller alır.

Çekirdek zarının yıkılması, bazı iğ mikrotübüllerinin, kromozomlara kinetokorlarından tutunmasına (Şekil 17.27) ve prometafaz için tanımlayıcı olan, kromozom göçünün başlamasına olanak sağlar. Kinetokorda toplanan proteinler, kromozomların hareketini sentrozoma bağlı iğ mikrotübüllerinin eksi uçlarına doğru yönelten mikrotübül motorlarını içerir. Kromozomları sentrozomlara doğru çeken bu proteinlerin hareketine, artı uç yönelimli motor proteinler ve kromozomları iğin kutuplarından uzaklaştıran mikrotübül uzaması karşı koyar. Sonuç olarak, prometafazdaki kromozomlar, sentrozomlar ve iğ merkezi arasında ileri geri yer değiştirirler.

İğin zıt kutuplarından gelen mikrotübüller, sonunda, kardeş kromatidlerin iki kinetokoruna (kromozomun iki yanında yerleşik olan) tutunur ve kromozomlar üzerine etki eden kuvvetlerin dengelenmesi, bunların iğin merkezindeki metafaz düzleminde dizilmesini sağlar (Şekil 17.28). Bölüm 13'de tartışıldığı



Şekil 17.28 Metafaz iği
(A) İğ dört farklı mikrotübül çeşidinden oluşur. Kinetekor ve kromozom mikrotübülleri kromozomlara tutunurlar, kutup mikrotübülleri hücrenin merkezinde çakışarak üst üste gelirler, ve yıldızsı mikrotübüller sentrozomlardan hücrenin çeperine doğru yayılırlar (B) Bir tatlı su balığının (*whitefish*) metafazdaki hücresi.

gibi iğ, hem kromozomlara tutunan kinetokor mikrotübülleri, hem de hücrenin ortasında birbirinin üstüne oturan polar mikrotübülleri içerir. Buna ek olarak, yıldızsı mikrotübüller sentrozomlardan hücre kenarlarına doğru yayılırlar.

Video 17.5
sites.sinauer.com/cooper7e/v17.5
İğ Kurulumu Kontrol Noktası
İğ kurulumu kontrol noktası, kromozomların metafaz iğinde hizaya girmelerini denetler.

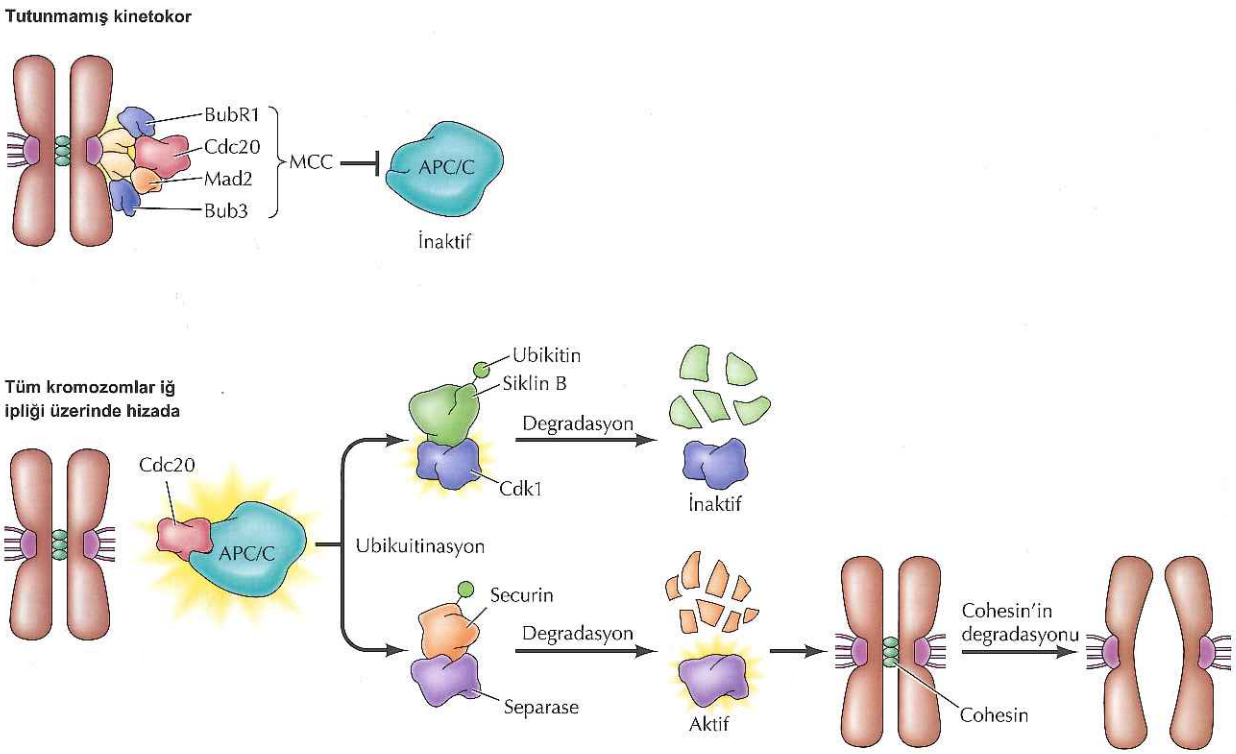
İğ kontrol noktası ve anafaza geçiş

Bu bölümde daha önce de tartışıldığı gibi, bir başka önemli hücre döngüsü kontrol noktası, kromozomların metafaz iği üzerinde dizilmelerini denetler. Bu süreç başarıyla tamamlandığında, hücre anafaza ilerler ve mitozu bitirir. Metafazdan anafaza geçiş, bazı anahtar düzenleyici proteinlerin ubikitin aracılığıyla proteolizi sonucunda olur. APC/C, S ve G_2 evreleri boyunca Cdk2/siklin E ve siklin A komplekslerince inhibe edilir. Mitozun başlangıcında ise, Cdk1/siklin B tarafından fosforilasyonu sonucunda APC/C'nin aktivasyonu uyarılır. APC/C, hücre iğ kontrol noktasını geçene kadar etkisiz kalır, bundan sonra, ubikütin-yıkım sisteminin etkinleşmesi, metafazdan anafaza geçişi ve mitozu tamamlamak üzere ilerlemeyi sağlar.

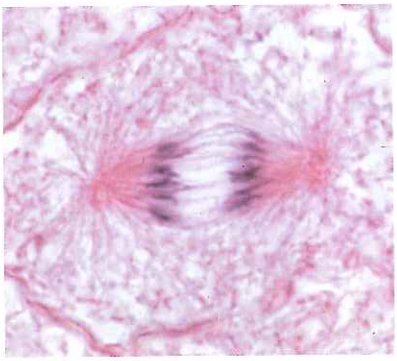
İğ kontrol noktası, sıraya girmemiş tek bir kromozom varlığının dahi, APC/C aktivasyonunu baskılamak için yeterli oluşuyla olağanüstüdür. Bu kontrol

Bilgi İçin

İğ kurulumu kontrol noktasındaki hatalar nedeniyle kromozomların ayrışma hataları, kanser hücrelerinde sıklıkla gözlemlenen bir durumdur ve bir çok tümörün gelişiminde önemli bir role sahiptir (bkz. Bölüm 19)



Şekil 17.29 İğ kurulumu kontrol noktası Anafaza ilerleme, anafaza ilerleten kompleks/siklozom (APC/C) ubikitin ligazın aktivasyonu aracılığıyla sağlanır. İğe tutunmamış kinetekorlar, bir protein kompleksinin (mitotik kontrol noktası kompleksi, MCC) oluşmasına ve APC/C'yi inhibe etmesine yol açarlar. Tüm kromozomlar hizaya girdiklerinde inhibe edici kompleks oluşmaz ve APC/C aktive edilir. APC/C siklin B'yi ubikitin ile işaretleyerek degradasyonuna ve Cdk1'in inaktivasyonuna yol açar. Ayrıca, APC/C securin'i (Separase isimli bir proteazın baskılayıcı alt ünitesi) ubikitin ile işaretleyerek degradasyonuyla separase aktivasyonunu sağlar. Separase, cohesin'in bir alt ünitesinin degradasyonunu sağlayarak kardeş kromatidleri bir arada tutan bağı kırar ve anafazı başlatır.



10 μm

Şekil 17.30 Bir tatlısu balığının (*whitefish*) anafazdaki hücresi

Video 17.6
sites.sinauer.com/cooper7e/v17.6
Metafaz ve Anafaz Metafazda, kromozomlar iğin ortasında hizaya girerler. Anafazda ise, kardeş kromatidler ayrılarak iğin karşıt kutuplarına göç ederler.

Animasyon 17.6
sites.sinauer.com/cooper7e/a17.6
Yüksek Bitkilerde Sitokinez Bitki hücreleri, hücre bölünmesi sırasında metafazın gerçekleşmiş olduğu hücrenin ortasındaki düzleme Golgi kaynaklı vesikülleri iletirler. Vesiküllerin birleşmesiyle oluşan disk şeklindeki yapı giderek büyüyerek plazma membranı ile birleşir.

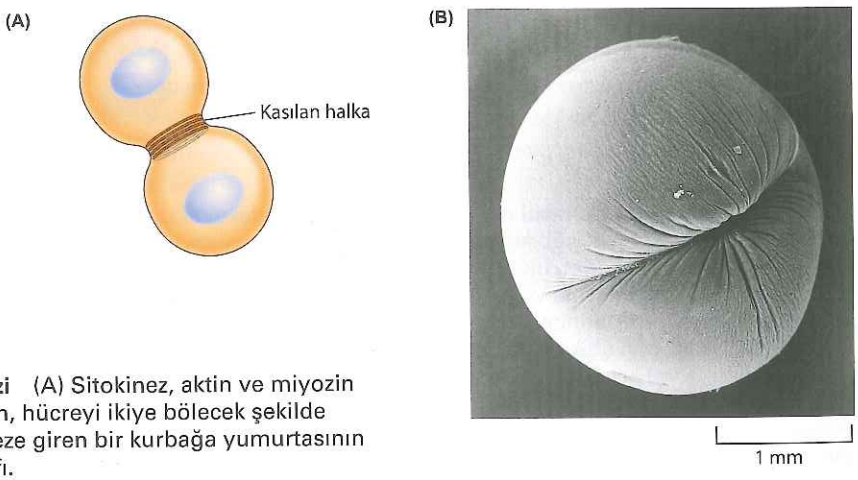
noktası, henüz tutunmamış kinetokorlar üzerinde oluşan ve APC/C'yi inhibe eden proteinlerden oluşan bir kompleks (**Mitotik kontrol noktası kompleksi** veya **MCC** olarak adlandırılır) aracılığıyla sürdürülür (**Şekil 17.29**). Mitotik kontrol noktası kompleksi dört proteinden oluşur: BubR1, Bub3, Mad2 ve Cdc20. Cdc20 proteini APC/C tarafından ihtiyaç duyulan bir aktivatördür, fakat MCC içerisinde Mad ve Bub proteinlerine bağlı kaldığında aktivitesi engellenir. Mikrotübüller kinetokorlara bağlandıklarında MCC kompleksleri oluşamaz ve Cdc20, APC/C'yi inhibe etmek yerine aktive etmeye başlar.

APC/C'nin aktivasyonu, metafazdan anafaza geçişi tetikleyen iki önemli hedef proteinin übikütinasyonu ve degredasyonuna yol açar. Anafazın başlangıcı, siklin B'nin yıkımıyla Cdk1'in inaktivasyonu ve metafaz düzleminde sıralanmış kardeş kromatidlerin bir arada tutulmasını sağlayan cohesin'lerin bir bileşeninin degradasyonu sonucudur (bkz. **Şekil 17.25**). Cohesin'lerin yıkımı direkt olarak APC/C tarafından kataliz edilmez. APC/C, separase isimli bir proteazı kısıtlayan securin proteininin yıkımını sağlar. Securin'in yıkımı, separase'ın aktivasyonuna ve sonuç olarak cohesin'lerin yıkımına sebep olur. Cohesin'lerin yıkımı, kardeş kromozomları bir arada tutan bağlantının kırılmasına ve iğ tarafından karşı kutuplara hareket etmelerine izin verir (**Şekil 17.30**). Kromozomların anafaz sırasında ayrılması, iğ mikrotübülleri ile bağlantılı çeşitli tiplerdeki motor proteinlerin aktivitesiyle sağlanır (bkz. Şekiller 13.51, 13.52).

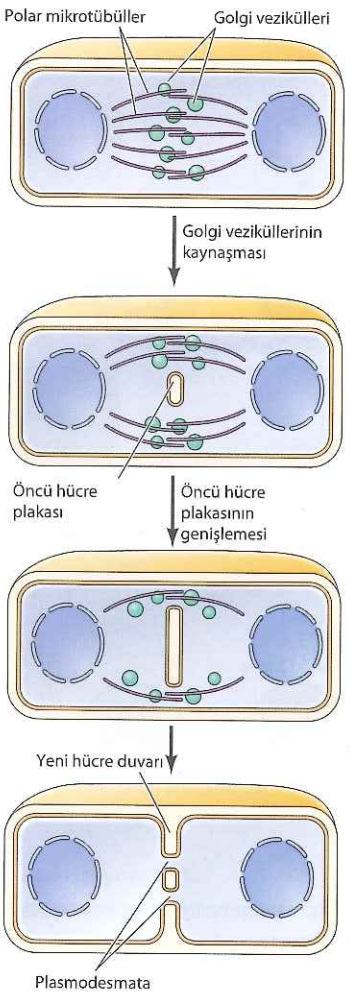
Hücre anafaz evresini bitirdiğinde, APC/C kompleksi, Aurora ve Polo-like kinazların degradasyonunu tetikleyerek, hücrenin mitozdan çıkmasına ve interfaza geçmesine yol açar. Bu geçişlerde gözlemlenen çoğu hücresel değişim, mitozda Cdk1, Aurora ve Polo-like kinaz tarafından uyarılan olayların sadece tersine çevrilmesi sonucudur. Örneğin, nükleer zarfın tekrar oluşturulması, kromatinin açılması, mikrotübüllerin interfazdaki durumlarına dönmesi gibi olaylar mitotik kinazların aktivitelerini kaybetmeleriyle paralel olarak mitozun başlangıcında fosforile edilen proteinlerin defosforile olmalarının direkt sonucudur. Bir sonraki bölümde bahsedilen sitokinezin tetikleyicisi de Cdk1'in aktivitesini yitirmesidir.

Sitokinez

Mitozun tamamlanmasına, çoğunlukla, iki yavru hücrenin oluşumuna neden olan sitokinez eşlik eder. Sitokinez genellikle anafazın başlamasından hemen



Şekil 17.31 Hayvan hücresi sitokinezi (A) Sitokinez, aktin ve miyozin filamanlarından oluşmuş bir halkanın, hücreyi ikiye bölecek şekilde daralmasıyla gerçekleşir. (B) Sitokineze giren bir kurbağa yumurtasının taramalı elektron mikroskop fotoğrafı.



Şekil 17.32 Yüksek bitkilerde sitokinez Hücre duvarı yapıtaşlarını taşıyan Golgi vezikülleri, daha önce metafaz plağının bulunduğu yerde, polar mikrotübüllere bağlanırlar. Veziküllerin birbirine kaynaşması sonucunda, dışa doğru genişleyerek atasal plazma zarıyla birleşecek olan, zarla çevrili disk şeklinde bir yapı ortaya çıkar (öncü hücre plakası). Yavru hücreler plazmodezmata'da birbirleriyle bağlantılı kalırlar.

sonra başlar ve Cdk1'in inaktivasyonu ile tetiklenir, böylelikle hücrenin nükleer ve sitoplazmik bölünmesi eş zamanlı olur. Aurora ve Polo-like kinazlar ise anafaz boyunca aktif kalarak hücrenin nükleer ve sitoplazmik bölünmesini koordine ederler.

Bölüm 13'de tartışıldığı gibi, hayvan hücrelerinin sitokinezi, plazma zarının altında, aktin ve miyozin II filamanlarından oluşan **kasılan halka** ile sağlanır (Şekil 17.31). Bu halkanın oluşumu Aurora ve Polo-like kinazlar tarafından aktive edilerek yerleşimi, mitotik iğin pozisyonu ile belirlenir, yani, sonunda hücre iğe dik, metafaz düzleminden geçen bir çizgide bölünür. Yarılma, aktin miyozin filamanlarının kasılması sonucu plazma zarının içeri çekilmesiyle devam eder ve sonunda hücre ortasından daralır. İki yavru hücresinin arasındaki köprü kırılır ve plazma zarı tekrar kapatılır.

Sert hücre duvarlarıyla çevrili gelişmiş bitki hücrelerinde sitokinez mekanizması farklıdır. Bu hücreler, daralan halka ile ortasından boğumlanarak değil, hücrenin içinde plazma zarı ve yeni hücre duvarı oluşturarak bölünürler (Şekil 17.32). Erken telofazda, hücre duvarı yapıtaşlarını taşıyarak Golgi aygıtından çıkan kesecikler, iğ mikrotübüllerine bağlanır ve metafaz düzleminin önceki konumunda birikirler. Bu kesecikler daha sonra büyük, zarla-çevrilmiş, disk benzeri yapı oluşturmak üzere kaynaşırlar ve içerdikleri polisakkaridler, yeni hücre duvarının (hücre plakası adı verilir) matrisini oluşturmak üzere birleşir. Hücre plakası, iğe dik olarak, plazma zarına ulaşıncaya kadar, dışa doğru genişler. Daha sonra, hücre plakasını çevreleyen zar, başlangıçtaki hücreye ait plazma zarı ile birleşerek hücreyi ikiye böler. Kardeş hücreler arası bağlantılar (plazmodezmata, bkz. Şekil 15.31) keseciklerin sitokinezde tamamlanmamış kaynaşmaları sonucudur.

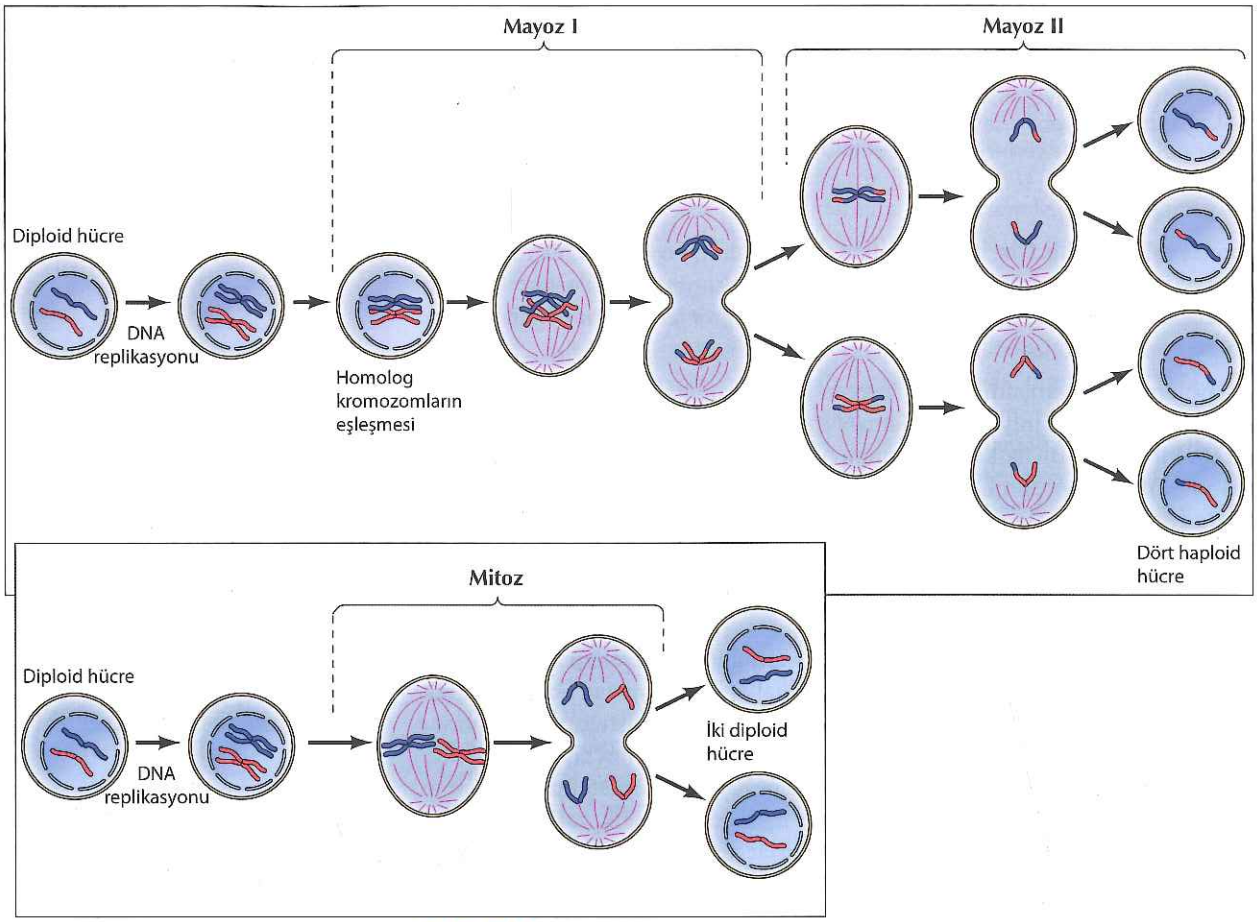
Mayoz ve Döllenme

Bu bölümde şu ana kadar tartışılan somatik hücre döngüleri, aynı miktarda genetik materyale sahip, diploid yavru hücrelerle sonuçlanır. Mayoz ise, kromozom sayısını yarıya indirerek haploid yavru hücrelerin oluşumuyla sonlanan, özelleşmiş bir tür hücre döngüsüdür. Mayalar gibi tek hücreli ökaryotlar, mitoz yoluyla üreyebildikleri gibi mayoza da girebilirler. Örneğin; diploid *Saccharomyces cerevisiae*, uygun olmayan çevre koşullarına maruz kaldığında mayoza girerek sporlar üretir. Çok hücreli bitki ve hayvanlarda ise, mayoz sadece, eşeyli üreme için gerekli olan üreme hücreleriyle sınırlıdır. Somatik hücreler çoğalmak için mitoza girerken, üreme hücreleri haploid eşey hücrelerini (sperm ve yumurta) oluşturmak üzere mayoza girerler. Yeni döl canlının gelişimi, döllenme sırasında bu eşey hücrelerinin kaynaşması ile başlar.

Animasyon 17.7
sites.sinauer.com/cooper7e/a17.7
Mayoz Mayoz ile bölünen bir hücre, kendi kromozom sayısının yarısına sahip olan kardeş hücreleri oluşturur.

Mayoz Süreci

Mitozun aksine, **mayoz**, bir diploid parental hücrenin, her biri diploid ebeveynin homolog kromozom çiftlerinden yalnız birini taşıyan, haploid yavru hücrelere

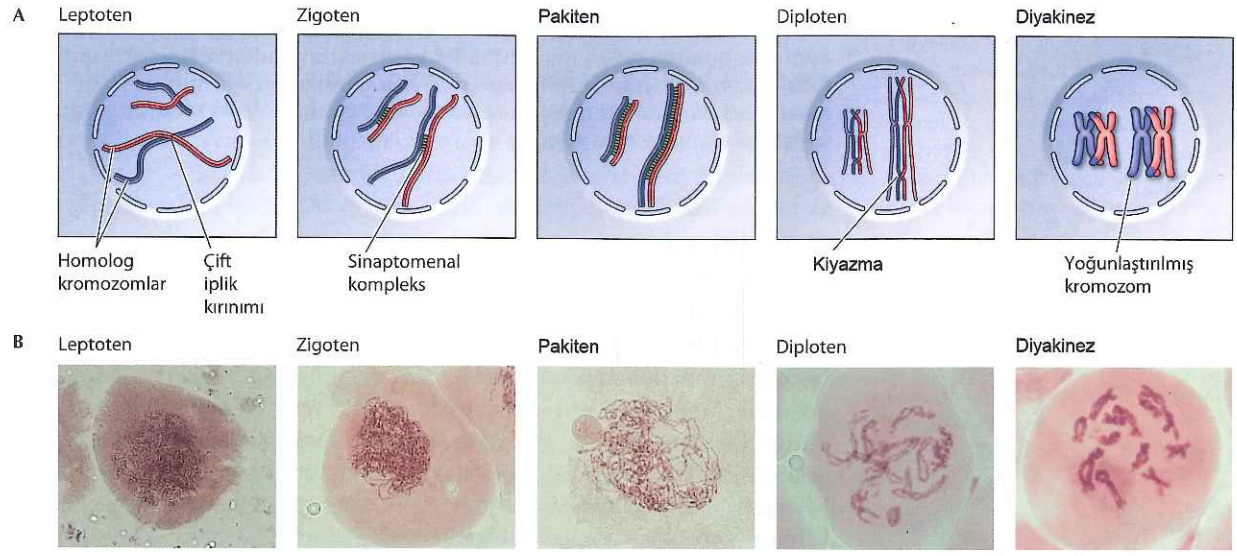


Şekil 17.33 Mayoz ile mitozun karşılaştırılması Hem mayoz hem de mitoz DNA replikasyonu sonrasında başladığı için, her kromozom iki kardeş kromatidden oluşmuştur. Mayoz I'de eş kromozomlar eşleştikten sonra farklı hücrelere ayrılırlar. Mayoz II'de kardeş kromatidlerin ayrılması normal mitozu andırır. Mayoz, böylece, dört yavru haploid hücre oluşmasını sağlar.

bölünmesiyle sonlanır (Şekil 17.33). Kromozom sayısındaki bu azalma, tek bir DNA replikasyon turunu izleyen, art arda iki nükleus ve hücre bölünmesi (mayoz I ve mayoz II olarak adlandırılır) ile sağlanır. Mitoz gibi, mayoz I de, S evresi tamamlandıktan ve parental kromozomlar identik kardeş kromotidleri oluşturmak üzere replike olduktan sonra başlar. Ancak, mayoz I'deki kromozom dağılım modeli mitozdakinden oldukça farklıdır. Mayoz I sırasında, homolog kromozomlar önce birbiriyle eşleşir ve sonra farklı yavru hücrelere ayrışırlar. Kardeş kromatidler bir arada kalırlar, böylelikle mayoz I'in tamamlanması, her kromozom çiftinin bir üyesine (iki kardeş kormatidden oluşan) sahip yavru hücrelerin oluşmasıyla sonuçlanır. Mayoz I'i, kardeş kromatidlerin ayrılması ve farklı yavru hücrelere dağılması ile mitozu andıran, mayoz II izler. Mayoz II'nin tamamlanması ile, her biri her kromozomun tek bir kopyasına sahip, dört haploid yavru hücre oluşur.

DNA replikasyonundan sonra homolog kromozomların eşleşmesi, babadan ve anneden gelen kromozomlar arasındaki rekombinasyonun sonucudur. Yani genetik rekombinasyon, mayoz esnasındaki kromozom dağılımı ile

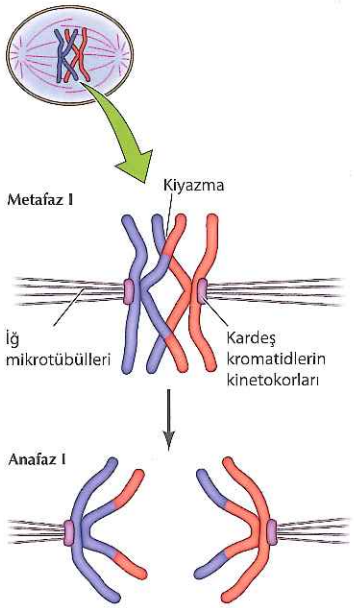
Animasyon 17.8
sites.sinauer.com/cooper7e/a17.8
Mayoz I ile Mitozun Kıyaslanması Mayoz ve mitoz arasındaki farklardan biri metafaz sırasında gözlemlenebilir. Mitoz bölünmenin metafazında, homolog kromozomlar ayrı ayrı metafaz düzleminde hizaya girerler. Mayoz I'in metafazında ise homolog kromozomlar çiftler halinde metafaz düzleminde hizalanırlar.



Şekil 17.34 Mayoz I'in profazının aşamaları (A) Kromozomlar arasında rekombinasyon, leptoten aşamasında çift-iplik kırıklarının oluşturulmasıyla başlatılır. Daha sonra, zigoten ve pakiten aşamalarında, homolog kromozomlar arasında sinaptonemal kompleks adı verilen fermuar benzeri bir yapı oluşur. Rekombinasyonun bitmesi, çapraz-değişim noktalarında kiyazmataların oluşmasına yol açar ve diploten aşamasında sinaptonemal kompleks kaybolur. Metafaza geçerken diyakinez aşamasında kromozomlar yoğunlaşır. (B) Zambak kromozomlarının morfolojisini gösteren mikroskop görüntüleri.

yakından ilişkilidir. Homolog kromozomlar arasındaki rekombinasyon, mayoz I'deki uzun ve kromozom morfolojisine göre beş evreye ayrılan (**leptoten**, **zigoten**, **pakiten**, **diploten** ve **diyakinez**) profaz sırasında gerçekleşir (Şekil 17.34). Mayoz sırasında rekombinasyon oldukça sık görülür, yüksek oranda korunmuş bir endonükleaz olan Spo11 tarafından, mayotik profazın erken evresinde (leptoten) indüklenen çift iplik kırılmaları ile başlatılır. Bölüm 7'de tartışıldığı gibi, çift iplik kırılmaları, komplemanter baz eşleşmesi ile homolog kromozomun içine uzanan tek iplikli bölgelerin oluşmasına yol açar (bkz. Şekil 7.29). Homolog kromozomların belli noktalarda birbirleriyle yakın birlikteliği (**sinapsis**), zigoten aşamasında başlar. Homolog kromozomların nasıl birbirleriyle eşleştikleri tam olarak bilinmemekle beraber, güncel çalışmalar kodlamayan RNA'ların burada görev aldıklarını önermektedir. Bu aşamada, eşleşmiş kromozomların uzunluğu boyunca, **sinaptonemal kompleks** olarak isimlendirilen fermuar benzeri protein yapı oluşur. Bu kompleks, birkaç gün sürebilen pakiten evresi boyunca homolog kromozomları bir arada ve yan yana tutar. Homolog kromozomlar arasındaki rekombinasyon, pakiten'in sonunda, çapraz-değişim noktalarından (**kiyazmata**; tekili, kiyazma) bağlı kromozomlar bırakarak tamamlanır. Sinaptonemal kompleks diploten evresinde kaybolur ve homolog kromozomlar tümüyle birbirinden ayrılır. Ancak, kiyazmata ile bağlı kalırlar ve bu, metafazda doğru dizilmeleri için gereklidir. Bu aşamada her kromozom çifti (bivalan olarak adlandırılır) belirgin kiyazmata noktalarıyla, dört kromatid içerir. Profaz I'in son evresi olan diyakinez, metafaza geçişin habercisidir ve bu evrede kromozomlar tamamen yoğunlaşırlar.

Animasyon 17.9
sites.sinauer.com/cooper7e/a17.9
Mayozun Profaz I Evresi
Mayozun profaz I evresi beş aşamadan oluşur. Kromozomlar yoğunlaşır ve homolog kromozomlar birbirleriyle eşleşerek rekombinasyon gerçekleştirirler.



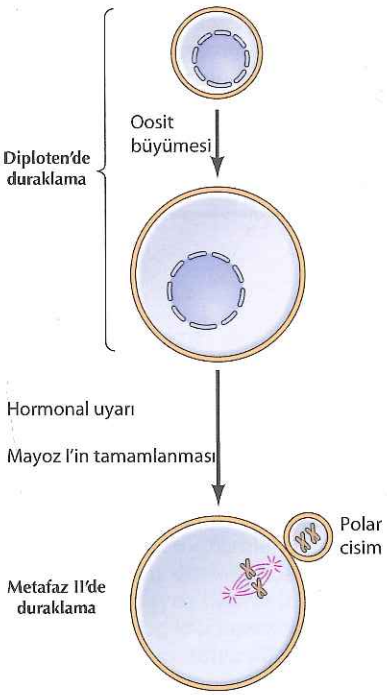
Şekil 17.35 Mayoz I'de kromozomların ayrışması Metafaz I'de kardeş kromatidlerin kinetokorları birbirine birleşik ya da bitişiktir. Bu nedenle, iğin aynı kutubundan gelen mikrotübüller kardeş kromatidlerin kinetokoruna tutunurken, zıt kutuplardan gelen mikrotübüller, eş kromozomların kinetokorlarına tutunur. Kiyazmalar anafaz I'de açılır ve eş kromozomlar iğin zıt kutuplarına hareket ederler.

Metafaz I'de bivalan kromozomlar iğ üzerinde dizilirler. Mitozun aksine (bkz **Şekil 17.28**), kardeş kromatidlerin kinetokorları, birbirine bitişik ve aynı yöne bakarken, homolog kromozomların kinetokorları iğin zıt kutuplarına bakar (**Şekil 17.35**). Dolayısıyla, iğin aynı kutbundan gelen mikrotübüller kardeş kromatidlere tutunurken, zıt kutuplardan gelen mikrotübüller homolog kromozomlara tutunurlar. Anafaz I, homolog kromozomları birleştiren kiyazmatanın ayrılmasıyla başlar. Sonrasında, kardeş kromatidler sentromerlerine bağlı kalırken, homolog kromozomlar birbirinden ayrılır. Mayoz I'in tamamlanmasıyla, her yavru hücre, her bir homolog çiftin, iki kardeş kromatidden oluşan bir üyesine sahip olur.

Sitokinezin hemen ardından, çoğunlukla, kromozomlar yoğunluklarını tamamen kaybetmeden önce, mayoz II başlar. Mayoz I'in aksine, mayoz II normal mitozu andırır. Metafaz II'de kromozomlar, zıt kutuplarından gelen mikrotübüller kardeş kromatidlerin kinetokorlarına tutunmuş olarak, iğin üzerinde dizilirler. Kardeş kromatidlerin sentromerleri arasındaki bağ anafaz II'de açılır ve kardeş kromatidler zıt kutuplara dağılırlar. Bunu, haploid yavru hücrelerin oluşumunu sağlayan, sitokinez izler.

Oosit mayozunun düzenlenmesi

Omurgalı oositleri (gelişen yumurtalar) özellikle büyüklükleri ve laboratuardaki kullanım kolaylıkları nedeniyle, hücre döngüsü araştırmalarında yararlı model olmuşlardır. Dikkate değer bir örnek olarak, bu bölümde önceden ele alınmış olan, MPF'nin (Cdk1/siklin B) kurbağa oositlerinde keşfi ve daha sonra da saflaştırılması gösterilebilir. Diğer türlerde olduğu gibi, bu oositlerin mayozu, hücre döngüsünde iki özel noktada düzenlenir ve oosit mayozu çalışmaları, yeni hücre döngüsü kontrol mekanizmalarına ışık tutmuştur.



Oosit mayozunun ilk düzenlenme noktası, birinci mayotik bölünmenin diploten aşamasındadır (**Şekil 17.36**). İnsanlarda, oositler bu aşamada 40 ila 50 yıl kadar uzun sürelerde bekleyebilir. Bu diploten duraklamasında, oosit kromozomları yoğunluk kaybederler ve aktif olarak transkribe olurlar. Bu transkripsiyonel aktivite, bu evrede oositlerin olağanüstü büyümelerinden anlaşılabilir. Örneğin, insan oositleri yaklaşık 100 µm çapındadır (tipik bir somatik hücrenin hacminin yüz katından fazla). Kurbağa oositleri, yaklaşık 1 mm çapları ile, daha da büyüktürler. Bu hücre büyümesi aşamasında oositler, embriyo gelişiminin erken evrelerinde gereksinim duyulacak olan, RNA ve protein gibi maddeleri stoklarlar. Bu bölümde daha önce bahsedildiği gibi,

Şekil 17.36 Omurgalı oositlerinin mayozu Mayoz diploten aşamasında durdurulur ve bu bekleme döneminde oosit büyür. Oosit daha sonra, hormonal uyarıya yanıt olarak, mayoza yeniden başlar ve ilk mayotik bölünmeyi, küçük bir kutup cismi oluşturan asimetrik sitokinezle tamamlar. Çoğu omurgalı oositleri metafaz II'de tekrar durdurulur.

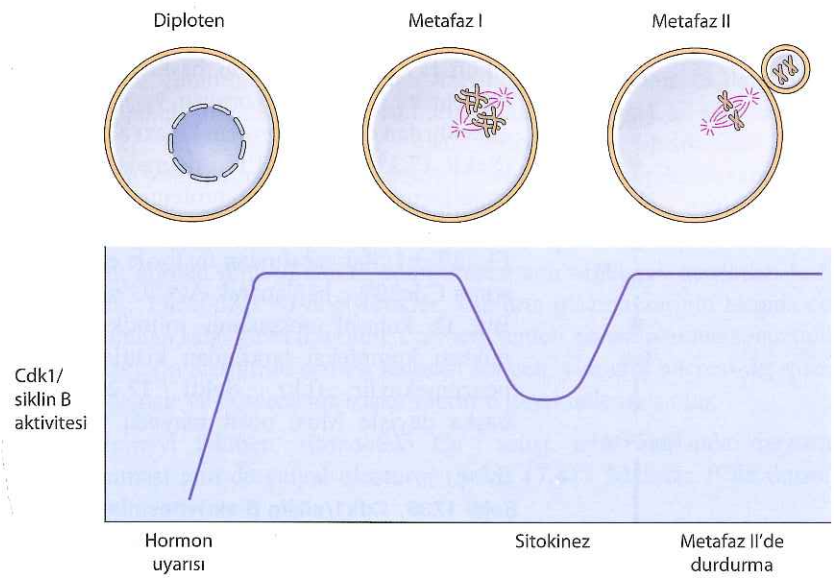
erken embriyonik hücre döngüleri hücre büyümesi olmadan gerçekleşir ve döllenmiş yumurta hızla küçük hücrelere bölünür (bkz. Şekil 17.2).

Farklı türlerin oositleri, mayozun ne zaman başlayacağı ve döllenmenin ne zaman gerçekleşeceği açısından farklılıklar gösterirler. Bazı hayvanlarda, oositler döllenince kadar diploten evresinde kalırlar ve ancak ondan sonra mayozu tamamlarlar. Ancak, omurgalıların çoğunun (kurbağalar, fareler ve insanlar gibi) oositleri, hormonal uyarıya yanıt olarak mayoza devam ederler ve döllenme öncesinde mayoz I'de ilerlerler. Mayoz I'i izleyen hücre bölünmesi, küçük bir **kutup cismi** ve büyük hacmini koruyan bir oosit oluşumuyla sonlanan, asimetrik bir bölünmedir. Oosit, daha sonra, yeni çekirdek oluşturmadan ve kromozomlarını açmadan, mayoz II'ye giriş için ilerler. Çoğu omurgalıların oositleri, daha sonra metafaz II'de tekrar duraklatılır ve döllenme oluncaya ya da bozuluncaya kadar burada bekletilirler.

Somatik hücrelerin M evresi gibi, oositlerin mayozu da Cdk1/siklin B kompleksleri tarafından kontrol edilir. Oosit mayozu sırasında Cdk1'in kontrolü, mayoz I'den mayoz II'ye geçiş ve metafaz II'de duraklamadan sorumlu olması gibi, belirli özellikler gösterir (Şekil 17.37). Diploten'de durdurulmuş olan oositlerin hormonal uyarımı, ilk önce, somatik hücrelerin G_2'den M'ye geçişine benzer şekilde Cdk1'i aktive ederek mayozun yeniden başlamasını tetikler. Mitozda olduğu gibi, Cdk1 daha sonra, kromozom yoğunlaşmasını, çekirdek zarfının yıkımını ve iğin oluşumunu başlatır. Anafaza-ilerleten kompleksin (APC/C) aktivasyonu, Cdk1'in aktivitesinin azalması ile birlikte, mayoz I'in metafazdan anafaza geçişini sağlar. Ancak, mitozun aksine, Cdk1 aktivitesi sadece kısmen azalır, böylece oosit M evresinde kalır, kromatinler kalınlaşmış kalır ve nükleer zarf yeniden oluşmaz. Sitokinezi takiben, Cdk1 aktivitesi

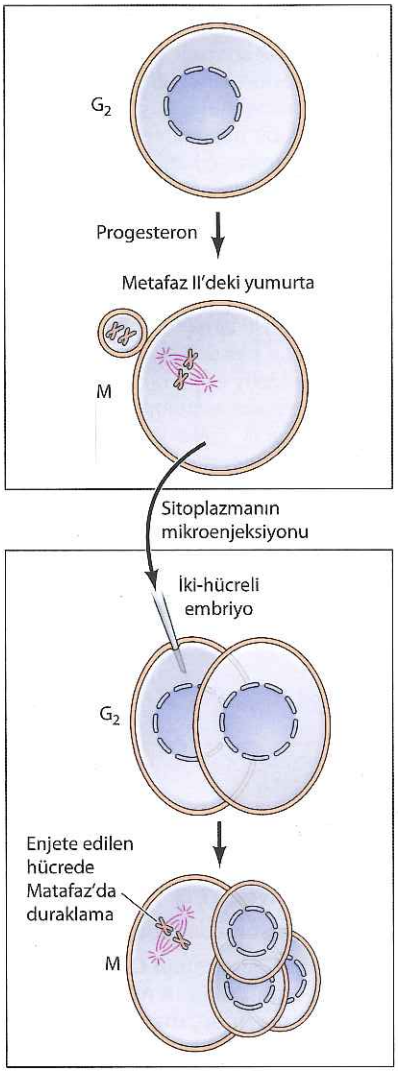
Bilgi için

Hayvanlar, somatik hücre çekirdek transferi isimli bir prosedür ile klonlanabilirler. Bu teknikte, somatik bir hücrenin çekirdeği, kromozomları çıkarılmış olan bir metafaz II evresi oositine aktarılır. Daha sonra oosit bölünmek üzere uyarılır. Oositlerin yeni bir dişi hayvana implantasyonunun ardından, genetik olarak somatik hücre çekirdeğiyle tamamen aynı yavru hayvanlar oluşturulabilir. 1997 yılında Dolly isimli bir koyunun klonlanmasının ardından, bu teknik uygulanarak çok sayıda memeli türü klonlanmıştır (bkz. Bölüm 18).



Şekil 17.37 Oosit mayozu sürecinde Cdk1/siklin B aktivitesi Diploten'de bekleyen oositin hormonal uyarımı, Cdk1/siklin B'yi aktifleyerek metafaz I'e ilerlemeyi sağlar. Cdk1/siklin B aktivitesi, metafaz I'den anafaz I'e geçerken, sadece kısmen azalır ve böylece, oosit M evresinde kalır. Mayoz I'in tamamlanmasını takiben Cdk1/siklin B aktivitesi tekrar yükselir ve metafaz II duraklaması süresince yüksek kalır.

Animasyon 17.10
sites.sinauer.com/cooper7e/a17.10
Kutup Cisimlerinin Oluşumu
Dişi omurgalıların mayoz bölünmesinde, mayoz bölünmeler genellikle eşit değildir ve büyük, tek bir yumurta ile çok daha küçük kutup cisimlerinin oluşumuyla sonuçlanır.

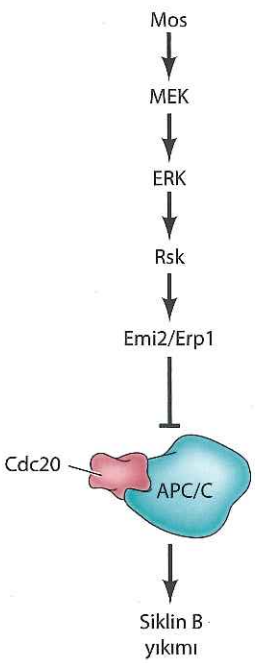


Şekil 17.38 Sitostatik faktörün tanımlanması Metafaz II'deki bir yumurtanın sitoplazması, iki hücreli embriyonun bir hücresine, mikroenjeksiyonla aktarıldı. Enjekte edilen hücre metafazda durdurulurken, enjekte edilmeyen hücre bölünmeye devam etti. Metafaz II'deki yumurtanın sitoplazmasında bulunan bir faktör (sitostatik faktör), enjekte edildiği embriyo hücresinde metafaz aşamasındaki duraklamayı uyarıyordu.

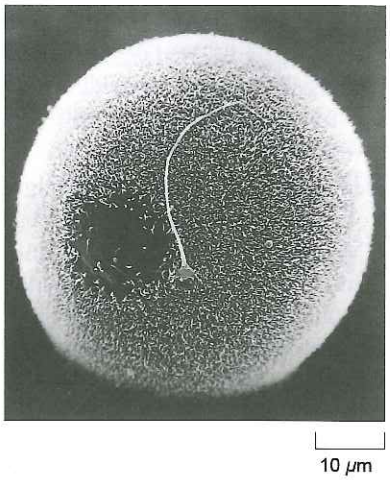
tekrar yükselir ve yumurta metafaz II'de tutulduğu sürece yüksek kalır. Oositlere özgün kontrol mekanizması, bu şekilde, mayoz I'de metafazından anafaza geçiş ve bunu izleyen metafaz II duraklaması süresince, normal bir M evresinde siklin B proteolizi sonucunda gerçekleşen Cdk1 inaktivasyonunu önleyerek, Cdk1 aktivitesinin devamlılığını sağlar.

Metafaz II duraklamasından sorumlu faktör, ilk olarak 1971'de Yoshio Masui ve Clement Markert tarafından, MPF'nin keşfini sağlayan aynı deney serileriyle tanımlanmıştır. Ancak, burada, metafaz II'de durmuş bir yumurtanın sitoplazması, mitotik hücre döngüsü içerisinde olan bir erken embriyo hücresine enjekte edilmiştir (Şekil 17.38). Yumurta sitoplazmasının enjeksiyonu, embriyonik hücrenin metafazda durmasına sebep olmuştur, ki bu da metafaz duraklamasının, yumurtada bulunan bir sitoplazmik faktör tarafından uyarıldığını göstermektedir. Bu faktör mitozu duraksattığı için, **sitostatik faktör** (**CSF**) olarak adlandırılmıştır.

Yakın zamandaki bir çok araştırma, **Mos** olarak bilinen bir protein-serin/treonin kinazı, CSF'nin temel bileşeni olarak tanımlamıştır. Mos özellikle mayoz I'in tamamlanmasına yakın zamanda, oositlerde sentezlenir ve metafaz II'deki duraklama esnasında olduğu kadar mayoz I'in metafazından anafazına geçişinde gerekli Cdk1/siklin B aktivitesinin korunması için gereklidir. Mos'un etkisi, önceki bölümde tartışılan hücre sinyal yolaklarında önemli bir role sahip ERK/ MAP kinazın aktivasyonu sonucunda ortaya çıkar. Ancak, oositlerde ERK'in rolü farklıdır; burada, MPF aktivitesinin devamlılığını, siklin B'nin hem yıkımını baskılayarak hem de sentezini uyararak koruyan ve Rsk olarak adlandırılan diğer bir protein kinazı aktive eder (Şekil 17.39). Siklin B'nin degradasyonunun engellenmesi, Emi2/Erp1 proteini aracılığıyla APC/C'nin kısıtlanmasıyla sağlanır. Emi2/Erp1, Rsk tarafından fosforile edildikten sonra Cdc20'ye bağlanarak APC/C'yi kısıtlar. Bu, iğ kontrol noktasının mitotik kontrol noktası kompleksi tarafından kısıtlanmasına benzemektedir (bkz. Şekil 17.29). Bir başka deyişle Mos, oosit mayozu sırasında



Şekil 17.39 Cdk1/siklin B aktivitesinin Mos protein kinaz tarafından korunması Mos protein kinaz, anafaza-ilerleten kompleks (APC/C) tarafından siklin B'nin degradasyonunu engelleyerek Cdk1/siklin B aktivitesini korur. Mos kinaz, etkisini, MEK, ERK, ve Rsk protein kinazlar aracılığıyla gösterir. Rsk tarafından fosforile edilen Emi2/Erp1 Cdc20'ye bağlanarak APC/C'nin aktivitesini kısıtlar.



Şekil 17.40 Döllenme Bir yumurtayı dölleyen insan sperminin taramalı elektronmikroskop görüntüsü.

Bilgi için

İn vitro döllenme (IVF), çocuk sahibi olamayan çiftlere yardımcı olmak amacıyla yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu teknikle, çeşitli üreme bozukluğu hastalıkları tedavi edilebilmektedir. Yumurtalıktan alınan metafaz II evresindeki yumurtalar, *in vitro* koşullarda döllenip, ana rahmine geri aktarılırlar. IVF tekniği kullanılarak üretilen ilk bebeğin 1978 yılında doğmasından sonra binlerce çift bu yolla çocuk sahibi olmuştur.

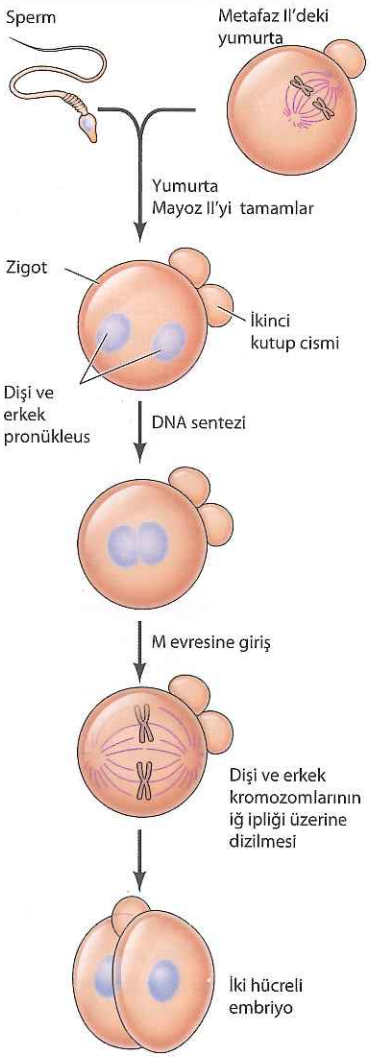
Cdk1/siklin B'nin aktivitesini sürdürmesini sağlayarak, metafaz II'de oositin duraklamasına neden olur. Oositler mayotik hücre döngüsünün bu noktasında, döllenmeyi bekleyerek, birkaç gün durabilir.

Döllenme

Döllenme esnasında, sperm, yumurta yüzeyindeki bir reseptöre bağlanır ve yumurtanın plazma zarıyla kaynaşarak, anne ve babadan gelen genetik bilgiyi içeren yeni diploid organizmanın oluşumunu başlatır (**Şekil 17.40**). Döllenme sadece babaya ve anneye ait kromozomların karışmasını değil, aynı zamanda yumurta sitoplazmasında, gelişminin ileri dönemlerinde kritik role sahip olacak bir seri değişikliği de başlatır. Bu değişiklikler yumurtayı aktifleştirerek, oosit mayozunun tamamlanmasına ve erken embriyonun mitotik hücre döngülerinin başlamasına yol açar.

Spermin, yumurtanın plazma zarı üzerindeki reseptörüne bağlanmasıyla başlayan önemli sinyallerden biri, yumurta sitoplazmasında Ca^{2+} seviyesindeki artışıdır ki, bu artış, olasılıkla, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfatın (PIP_2) hidrolizinin sonucudur (bkz. Şekil 16.36). Hücre içi Ca^{2+} seviyesindeki bu artışın bir etkisi, yumurtaya başka sperm girişini engelleyecek yüzey değişikliklerini başlatmaktır. Yumurtalar aynı anda çok sayıda spermle karşılaştıkları için, bu durum, normal diploid embriyonun oluşumunu sağlamak açısından kritik bir olaydır. Yüzeydeki bu değişiklikler, yumurta plazma zarının altında çok sayıda bulunan salgı keseciklerinin, Ca^{2+} tetiklemeli eksositozunun sonucudur. Bu keseciklerin içeriğinin serbest kalması sonucu, yumurta hücresi-dış yüzey katmanı değişir ve böylece bir başka spermin girişi önlenmiş olur.

Döllenmeyi takiben, sitozoldeki Ca^{2+} artışı, aynı zamanda mayozun tamamlanması için de sinyal oluşturur (**Şekil 17.41**). Metafaz II'de durmuş



Şekil 17.41 Döllenme ve mayozun tamamlanması Döllenme, metafaz II'den anafaz II'ye geçişi indükleyerek, oosit mayozunun tamamlanmasına ve ikinci kutup cisminin çıkışına (ki genellikle yıkılır) yol açar. Sperm çekirdeği yoğunluğunu kaybeder ve böylece döllenmiş yumurta (zigot) iki haploid nükleusa (dişi ve erkek pronükleus) sahip olur. Memelilerde iki pronükleus birbirine doğru hareket ederken DNA'larını kopyalarlar. Sonra, dişi ve erkek kromozomları ortak bir iğ üzerine dizilir ve mitoz başlar. Mitozun ve sitokinezin tamamlanmasıyla, her bir hücrenin diploid genoma sahip olduğu, iki-hücreli embriyo oluşur.

yumurtalarda metafazdan anafaza geçiş, APC/C'nin kısıtlayıcısı Emi2/Erp1'in Ca^{2+} bağımlı degradasyonu sonucu, APC/C aktivasyonu ile başlatılır (bkz. Şekil 17.39). Bunun sonucu olarak siklin B ve cohesin'in degradasyonu ikinci mayotik bölünmenin tamamlanmasını sağlar, ve asimetrik sitokinez sonucunda (Mayoz I'deki gibi) ikinci polar cisimcik oluşur.

Oosit mayozunun tamamlanmasını takiben, döllenmiş yumurta (artık **zigot** olarak adlandırılır), her biri bir ebeveynden olmak üzere, iki haploid çekirdeğe (**pronükleus** olarak adlandırılır) sahiptir. Memelilerde, bu iki pronükleus, S evresine girer ve birbirlerine doğru ilerlerken DNA'larını replike ederler. Birbirlerine ulaştıklarında, zigot ilk mitotik bölünmesi için M evresine girer. İki çekirdeğin de zarfı yıkılır, anne ve babadan gelen kalınlaşmış kromozomlar ortak iğ üzerinde dizilirler. Mitozun tamamlanması ile, her biri yeni diploid genom içeren iki embriyonik hücre oluşur. Bu hücreler, daha sonra, yeni bir organizmanın oluşumunu sağlayacak olan, bir seri embriyonik hücre bölünmesine başlarlar.

ÖZET

Ökaryot Hücre Döngüsü

- ***Hücre döngüsünün evreleri:*** Ökaryot hücre döngüleri dört farklı evreye ayrılır: M, G_1, S ve G_2. M evresi, genellikle, sitokinezin izlediği mitozu kapsar. S evresi DNA replikasyonu sürecidir. Bkz. **Animasyonlar 17.1 ve 17.2 – Video 17.1**
- ***Hücre döngüsünün, hücre büyümesi ve ekstraselüler sinyallerle tarafından denetlenmesi:*** Hücre dışı sinyaller ve hücrenin boyutları, hücre döngüsünün özel kontrol noktalarından geçişi düzenler. Bkz. **Video 17.2**
- ***Hücre döngüsü kontrol noktaları:*** Kontrol noktaları ve 'feedback' kontroller, hücre döngüsünün farklı evrelerinde yer alan olayları koordine eder ve DNA'nın hasarlı olması halinde hücre döngüsünü durdurur. Bkz. **Animasyon 17.3**

Hücre Döngüsü ilerlemesinin Düzenleyicileri

- ***Protein kinazlar ve hücre döngüsünün düzenlenmesi:*** MPF, tüm ökaryotlarda, G_2'den M evresine geçişin düzenlenmesinden sorumlu olan anahtar moleküldür . MPF, Cdk1 protein kinaz ve siklin B'den oluşan bir dimerdir. Bkz. **Animasyon 17.4**
- ***Siklin ve siklin-bağımlı kinaz aileleri:*** Farklı siklin ve Cdk1-benzeri protein kinaz çiftleri, hücre döngüsünün farklı evrelerinin ilerleyişini denetlerler. Cdk'lerin aktiviteleri siklinlerin ve Cdk inhibitörlerinin bağlanmasıyla düzenlenir.
- ***Büyüme faktörleri ve G_1 Cdk'lerin regülasyonu:*** Büyüme faktörleri D tipi siklinlerin sentezini uyararak hayvan hücrelerinin çoğalmasını stimüle ederler. Daha sonra Cdk4,6/siklin D kompleksleri, hücrenin G_1'deki restriksiyon noktasını aşmasını sağlarlar. Cdk4,6/siklin D komplekslerinin anahtar substratlarından biri, siklin E gibi hücre döngüsünün ilerlemesi için ihtiyaç duyulan genlerin transkripsiyonunu regüle eden Rb'dir. Daha sonra, Cdk2/ siklin E komplekslerinin aktivasyonu sayesinde hücre S evresine girer.
- ***S evresi ve DNA replikasyonunun düzenlenmesi:*** Cdk2/siklin E, DDK kinaz ile birlikte orijinlerde MCM helikazları aktive ederek DNA replikasyonunu başlatır. MCM bir kez aktive edildikten sonra, replikasyonun ikinci bir kez yeniden başlatılması, mitoz bölünme tamamlanana kadar yüksek kalan Cdk aktivitesi sayesinde engellenir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

mitoz, interfaz, sitokinez, M evresi, G_1 evresi, S evresi, G_2 evresi, akış sitometresi, floresan ile aktive olan hücre ayırıcı

START, restriksiyon noktası, G_0

hücre döngüsü kontrol noktaları, DNA hasarı kontrol noktası, iğ kurulumu kontrol noktası

Olgunlaşmayı ilerleten faktör (MPF), Cdk1, siklin, anafaza ilerleten kompleks/siklozom (APC/C)

G_1 siklin, Cln, Cdk, Cdk inhibitörü (CKI)

Rb, tümör baskılayıcı gen, E2F

ÖZET

- ***DNA hasarı kontrol noktaları:*** DNA hasarı ya da eksik olarak replike olan DNA hücre döngüsünün G_1, S, and G_2 evrelerinde ilerlemesini durdurur. Hücre döngüsünün durdurulması, DNA hasarı ile uyarılan ve Cdk aktivasyonu için gerekli olan Cdc25 fosfatazları baskılayan protein kinazlar aracılığıyla sağlanır. Memeli hücrelerinin G_1 kontrol noktasında durdurulması, aynı zamanda Cdk baskılayıcısı p21'in sentezini uyaran p53 tarafından da sağlanır

ANAHTAR SÖZCÜKLER

ATM, ATR, kontrol noktası kinazı, p53

M Evresi Olayları

- ***Mitozun Aşamaları:*** Geleneksel olarak mitoz dört aşamada gerçekleşir: profaz, metafaz, anafaz ve telofaz. Mitozun temel olayları; kromozom yoğunlaşması, mitoz iğinin oluşması, çekirdek kılıfının yıkılması ve iğ mikrotübüllerinin kromozomların kinetokorlarına tutunmasıdır. Sonra, kardeş kromatidler birbirinden ayrılarak iğin zıt kutuplarına doğru hareket ederler. En sonunda, nükleus yeniden oluşur, kromozomlar yoğunluklarını kaybeder ve sitokinez hücreyi ortadan ikiye ayırır. Bkz. **Animasyon 17.5** ve **Video 17.3–17.4**

profaz, metafaz, anafaz, telofaz, sentromer, kinetokor, sentrozom, mitotik iğ, prometafaz

- ***Mitoza giriş:*** M evresi, kromatin yoğunlaşması, nükleer zarfın yıkımı, golgi aygıtının fragmantasyonu, ve mitotik iği oluşturmak üzere mikrotübüllerin yeniden organizasyonu olaylarından sorumlu olan Cdk1/ siklin B, Aurora ve Polo-like kinazların aktivasyonu ile başlatılır. Daha sonra, iğ mikrotübüllerinin kardeş kromatidlerin kinetokorlarına tutunması ile bunlar metafaz düzleminde sıralanırlar.

Aurora kinaz, Polo-like kinaz, condensin, cohesin

- ***İğ kontrol noktası ve anafaza geçiş:*** Anafaza-ilerleten kompleks/siklozom (APC/C) isimli übikitin ligazın aktivasyonu, metafazdan anafaza geçişte anahtar proteinlerin degradasyonuna yol açar. APC/C aktivitesi, hücreler iğ kurulumu kontrol noktasını geçene ve tüm kromozomlar iğ üzerinde düzgün bir şekilde sıralanana kadar baskılanır. APC/C tarafından başlatılan übikitin aracılığıyla proteoliz cohesin'lerin degradasyonuyla kardeş kromatidler arasındaki bağın anafaz başlangıcında kırılmasına yol açar. APC/C ayrıca siklin B'yi übikitin ile işaretleyerek, Cdk1'in inaktivasyonuna ve mitozdan çıkışa yol açar. Bkz. **Video 17.5 ve 17.6**

anafaza-ilerleten kompleks/ siklozom (APC/C)

- ***Sitokinez:*** MPF inaktivasyonu sitokinezi de tetikler. Hayvan hücrelerinde, aktin ve miyozinden oluşan bir halkanın daralması sitokinezi sağlar.Yüksek bitkilerin hücrelerinde sitokinez, hücrenin içerisinde yeni bir hücre duvarının ve plazma zarının oluşmasıyla gerçekleşir. Bkz. **Animasyon 17.6**

kasılan halka

Mayoz ve Döllenme

- ***Mayoz süreci:*** Mayoz, haploid yavru hücrelerin oluşumunu sağlayan, özelleşmiş bir hücre döngüsüdür. Tek bir tur DNA replikasyonunu peş peşe iki hücre bölünmesi izler. Mayoz I'de, eş kromozomlar önce eşleşir sonra ayrı yavru hücrelere dağılırlar. Mayoz II ise, kardeş kromatidlerin ayrılmasıyla normal mitoza benzer. Bkz. **Animasyon 17.7-17.9**

mayoz, leptoten, zigoten, pakiten, diploten, diyakinez, sinaps, sinaptonemal kompleks, kiyazma

- ***Oosit mayozunun düzenlenmesi:*** Omurgalı oositlerinde mayoz, hücre döngüsünde iki noktada kontrol edilir: mayoz I'in diploten aşamasında ve mayoz II'nin metafazında. Metafaz II' deki duraklamanın nedeni, anafaza-ilerleten kompleksin, oositte sentezlenen bir protein kinaz tarafından inhibisyonudur. Bkz. **Animasyon 17.10**

kutup cismi, sitostatik faktör (CSF), Mos

- ***Döllenme:*** Döllenme, anafaza-ilerleten kompleksin Ca^{2+} -bağımlı aktivasyonu yoluyla oosit mayozunun yeniden başlamasını tetikler. Döllenmiş yumurtada başlangıçta var olan iki haploid nükleus yeni diploid genomu oluşturur ve embriyonik hücre bölünmeleri başlar.

döllenme, zigot, pronükleus

Atıf

Hücre

Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Sorular

1. G_0 ve G_1'deki hücreler hangi yönleriyle benzerdirler? Farklılıkları nelerdir?
2. Radyasyon DNA'ya zarar vererek hücre döngüsünü, G_1, S ve G_2 kontrol noktalarında durdurur. Bunun hasarlı hücreler açısından yararı nedir?
3. Cdk aktivitesini regüle eden mekanizmalar nelerdir?
4. İğ kontrol noktası, tüm kromozomlar iğin üzerinde uygun şekilde dizilene kadar, anafazın başlamasını geciktirir. Bu kontrol noktasının yetersiz olması ve kromozomlardan biri, sadece tek sentrozomdan gelen mikrotübüllere bağlıyken anafazın başlamasına olanak vermesinin sonucu ne olacaktır?
5. Cdk7'yi hedefleyen siRNA'ların espresyonu sonucu etkilenecek hücresel süreçler nelerdir?
6. Cdk inhibitörü pl6, özgül olarak, Cdk4, 6 / siklin D komplekslerine bağlanır. pl6'nın fazla üretilmesinin, hücre döngüsünün ilerleyişi üzerindeki tahmini etkisi ne olacaktır? pl6 fazla üretimi, işlevsel Rb proteinine sahip olmayan bir tümör hücresini etkiler mi?
7. Klonlanmış lamin cDNA'ları, MPF tarafından fosfatlanmayan mutantlar oluşturmak üzere, *in vitro* mutasyona uğratıldı. Bu mutant laminlerin ekspresyonu, profaz sonunda nükleer zarfın yıkımını nasıl etkileyecektir?
8. Cdk1/siklin B bağımlı fosforilasyonu, mitoza girmek için gerekli olan MPF substratları nelerdir?
9. Anafaza-ilerleten kompleks/siklozom (*Anaphase promoting complex/cyclosome*, APC/C) tarafından yıkıma dirençli siklin B mutantları elde edilmiştir. Bu siklin B mutantlarının ekspresyonu, metafazdan anafaza geçişteki olayları nasıl etkileyecektir?
10. Kardeş kromatidlerin ayrımında Anafaza-ilerleten kompleks/siklozom (*Anaphase promoting complex/cyclosome*, APC/C) nasıl etki eder?
11. Farede *mos* geni, homolog rekombinasyonla inaktive ediliyor. Bunun, oosit mayozu üzerindeki etkisinin ne olmasını beklersiniz?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

(Her ana bölüm için en önemli derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Ökaryot Hücre Döngüsü

Cimprich, K. A. and D. Cortez. 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 616-627. [R]

Forsburg, S. L. and P. Nurse. 1991. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe. Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 227-256 . [R]

Harper, J. W. and S. J. Elledge . 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol. Cell* 28: 739-745. [R]

Hartwell, L. H. and T. A. Weinert. 1989. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634. [R]

Jackson, S. P. and J. Bartek. 2009. The DNA damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071-1078. [R]

Morgan, D. O. 2007. *The Cell Cycle: Principles of Control.* New Science Press: London.

Norbury, C. and P. Nurse. 1992. Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 441-470. [R]

Pardee, A. B. 1989. G1events and the regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603-608. [R]

Russell, P. 1998. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem. Sci.* 23: 399-402. [R]

Hücre Döngüsü İlerlemesinin Düzenleyicileri

Arias, E. E. and J. C. Walter. 2007. Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev.* 21: 497-518. [R]

Blow, J. J. and A. Dutta. 2005. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 476-486. [R]

Besson, A., S. F. Dowdy and J. M. Roberts. 2008. CDK inhibitors: cell

cycle regulators and beyond. *Dev. Cell* 14: 159-169. [R]

Bloom, J. and F. R. Cross. 2007. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 149-159. [R]

Boutros, R., V. Lobjois and B. Ducommun. 2007. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nature Rev. Cancer* 7: 495-507. [R]

Bracken, A. P., M. Ciro, A. Cocito and K. Helin. 2004. E2F target genes: Unraveling the biology. *Trends Biochem. Sci.* 29: 409-4 17. [R]

Chen, H.-Z., Tsai, S.-Y. and G. Leone. 2009. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature Rev. Cancer* 9: 785-797. [R]

Dick, F. A. and S. M. Rubin. 2013. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 297-306. [R]

Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel and T. Hunt. 1983. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389-396. [P]

Harper, J. W. and S. J. Elledge. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol. Cell* 28: 739-745. [R]

Hartwell, L. H., R. K. Mortimer, J. Culotti and M. Culotti. 1973. Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of *cdc* mutants. *Genetics* 74: 267-287. [P]

Hills, S. A. and J. F. X. Diffley. 2014. DNA replication and oncogene-induced replicative stess. *Current Biol.* 24: R435-R444. [R]

Lohka, M. J., M. K. Hayes and J. L. Maller. 1988. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 3009-3013. [P]

Malumbres, M. and M. Barbacid. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Rev. Cancer* 9: 153-167. [R]

Masui, Y. and C. L. Markert. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior duringmeiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177: 129-146. [P]

Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: Cyclins revisited. *Cell* 116: 221-234. [R]

Pines, J. 2011. Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 427-438. [R]

Reinhardt, H. C. and M. B. Yaffe. 2009. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current Opin. Cell Biol.* 21: 245-255. [R]

Sclafani, R. A. and T. M. Holzen. 2007. Cell cycle regulation of DNA replication. *Ann. Rev. Genet.* 41: 237-280. [R]

Smith, L. D. and R. E. Ecker. 1971. The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* 25: 232-247. [P]

Swenson, K. I., K. M. Farrell and J. V. Ruderman. 1986. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 47: 861-870. [P]

Vousden, K. H. and D. P. Lane. 2007. p53 in health and disease. Nature *Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 275-283. [R]

M Evresi Olayları

Archambault, V. and D. M. Glover. 2009. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 265-275. [R]

Barr, F. A., H. H. W. Sillje and E. A. Nigg. 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 429-440. [R]

Carmena, M. and W. C. Earnshaw. 2003. The cellular geography of Aurora kinases. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 842-854. [R]

Cheeseman, I. M. and A. Desai. 2008. Molecular architecture of the kinetochore microtubule interface. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 33-45. [R]

De Gramont, A. and O. Cohen-Fix. 2005. The many phases of anaphase. *Trends Biochem. Sci.* 30: 559-568. [R]

Foley, E. A. and T. M. Kapoor. 2013. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signaling at the kinetochore. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 25-37. [R]

Glotzer, M. 2005. The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307: 1735-1739. [R]

Guttinger, S., E. Laurell and U. Kutay. 2009. Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 178-191. [R]

Jongsma, M. L. M., I. Berlin and J. Neefjes 2015. On the move: organelle dynamics during mitosis. *Trends Cell Biol* . 25: 112-124. [R]

Jurgens, G. 2005. Plant cytokinesis: Fission by fusion. *Trends Cell Biol.* 15: 277-283. [R]

Kline-Smith, S. L. and C. E. Walczak. 2004. Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: Refocusing on microtubule dynamics. *Mol. Cell* 15: 317-327. [R]

Lara-Gonzalez, P., F. G. Westhorpe and S. S. Taylor. 2012. The spindle assembly checkpoint. *Current Biol.* 22: R966-R980. [R]

Lens, S. M . A., E . E. Voest and R. H. Medema. 2010. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nature Rev. Cancer* 10: 825-841. [R]

Losada, A. and T. Hirano. 2005. Dynamic molecular linkers of the genome: The first decade of SMC proteins. *Genes Dev.* 19: 1269-1287. [R]

Lowe, M. and F. A. Barr. 2007. Inheritance and biogenesis of organelles in the secretory pathway. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 429-439. [R]

Ma, H. T. and R. Y. C. Poon. 2011. How protein kinases coordinate mitosis in animal cells. *Biochem. J.* 435: 17-31. [R]

Musacchio, A. and E. D. Salmon. 2007.

The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 379-393. [R]

Peters, J.-M., A. Tedeschi and J. Schmitz. 2008. The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev.* 22: 3089-3114. [R]

Petronczki, M., P. Lenart and J.-M. Peters. 2008. Polo on the rise–from mitotic entry to cytokinesis with Plk1. *Dev. Cell* 14:646-659. [R]

Rieder, C. L. and A. Khodjakov. 2003. Mitosis through the microscope: Advances in seeing inside live dividing cells. *Science* 300: 91-96. [R]

Sivakumar, S. and G. J. Gorbsky. 2015. Spatiotemporal regulation of the anaphasepromoting complex in mitosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 82-94. [R]

Sullivan, M. and D. O. Morgan. 2007. Finishing mitosis, one step at a time. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 894-903. [R]

Walczak, C. E., S. Cai and A. Khodjakov. 2010. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nature Mol. Cell Biol.* 11:91-102. [R]

Wood, A. J., A. F. Severson and B. J. Meyer. 2010. Condensin and cohesin complexity: the expanding repertoire of functions. *Nature Rev. Genet.* 11:391-404. [R]

Zitouni, S., C. Nabais, S. C. Jana, A. Guerrero and M. Bettencourt-Dias. 2014. Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 433-452. [R]

Mayoz ve Döllenme

Baudat, F., Y. Imai and B. de Massy. 2013. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nature Rev. Genet.* 14:794-806. [R]

Bhalla, N. and A. F. Dernburg . 2008. Prelude to a division. *Ann. Rev. Cell Biol.* 24: 397-424. [R]

Clift, D. and M. Schuh. 2013. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 549-562. [R]

Hawley, R. S. and W. D. Gilliland. 2009. Homologue pairing: getting it right. *Nature Cell Biol.* 11: 917-918. [R]

Page, S. L. and R. S. Hawley. 2003. Chromosome choreography: The meiotic ballet. *Science* 301: 785-789. [R]

Pawlowski, W. P. and W. Z. Cande. 2005. Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends Cell Biol.* 15: 674-681. [R]

Pesin, J. A. and T. L. Orr-Weaver. 2008. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Ann. Rev. Cell Biol.* 24: 475--499. [R]

Petronczki, M., M. F. Siomos and K. Nasmyth. 2003. Un menage a quatre: The molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112: 423-440. [R]

BÖLÜM 18

Hücre Ölümü ve Hücre Yenilenmesi

Programlı Hücre Ölümü 691

Kök Hücreler ve Erişkin Dokularının Korunması 703

Pluripotent Kök Hücreler, Hücresel Yeniden Programlanma ve Rejeneratif Tıp 712

Anahtar Deney
Programlı Hücre Ölümü İçin Gerekli Genlerin Tanımlanması 694

Anahtar Deney
Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü 713

Çok hücreli organizmaların yaşamları boyunca hücre ölümü ve yaşamı denge halindedir. Hayvan gelişimi embriyonik hücrelerin hızlı proliferasyonu ile başlar, daha sonra bu hücreler erişkin dokuları ve organları meydana getiren özelleşmiş birçok hücreyi oluşturmak üzere farklılaşır. Nematod *C. elegans* 959 somatik hücreden oluşurken, insanlar 200'den fazla farklılaşmış hücre tipini kapsayan toplamda yaklaşık 10^{14} hücreye sahiptirler. Vücudun tüm farklı hücre tipleri tek bir hücreden—döllenmiş yumurta—başlayarak doku ve organlar şeklinde düzenlenir. Gelişimin bu karmaşık sürecine, sadece hücre proliferasyonu ve farklılaşması değil, aynı zamanda hücre ölümü de katılır. Hücreler, toksik kimyasallara maruz kalma gibi öngörülemeyen travmatik bir olay sonucu ölebilecekleri gibi, çok hücreli organizmalarda hücre ölümleri, hem embriyonik gelişimde hemde erişkin dokularda önemli bir rol oynayan normal bir fizyolojik işlem olan programlanmış hücre ölümü ile gerçekleşir.

Erişkin organizmalarda, hücre ölümü hücre yenilenmesi ile dengelenmelidir, ve çoğu dokular kaybettikleri hücrelerin yerini alabilen kök hücreler içerirler. Hücre ölümündeki anormallikler kanser, otoimmün hastalıklar, Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların dahil olduğu geniş bir hastalık grubu ile ilişkilidir. Bunun aksine, çoğalarak ve farklılaşarak geniş bir çeşitlilik gösteren hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahip olan kök hücrelerin, özellikle de embriyo kök hücrelerinin, zarar görmüş dokularda kullanım olasılığı büyük ilgi uyandırmıştır. Böylece hücre ölümü ve hücre yenilenmesinin mekanizmaları ve düzenlenmesi biyoloji ve tıpta ön plandaki araştırma alanları olmuştur.

Programlı Hücre Ölümü

Programlı hücre ölümü, tüm organizmanın her bir hücresinin kaderini belirlediğinden, dikkatlice düzenlenmektedir. Erişkinlerde, programlı hücre ölümü, hücre çoğalmasını dengelemekten ve hücre yenilenmesi geçiren dokularda hücre sayılarını korumaktan sorumludur. Örneğin, insanlardaki yaklaşık $5x10^{11}$ kadar kan hücresi, kemik iliğindeki sürekli üretimlerini dengelemek için, günlük olarak programlı hücre ölümü ile ortadan kaldırılır. Buna ek olarak, programlı hücre ölümü organizmanın korunması için hasarlı ve potansiyel tehlikeli hücreleri yok edilebilen bir savunma mekanizması oluşturur. Virüs ile enfekte olan hücreler, genellikle, programlı hücre ölümüne gider. Böylece konak organizmada yeni virüs üretimi önlenir ve virüsün yayılması sınırlanır. DNA hasarı gibi, hücresel yıkımların diğer tipleri de programlanmış hücre ölümünü uyarır. DNA hasarı durumunda, programlı hücre ölümü ile, kanser gelişimine yol açabilecek mutasyonlar taşıyan hücreler dahil olmak üzere, potansiyel olarak zararlı mutasyonları taşıyan hücreler de ortadan kaldırabilir.

Video 18.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v18.1
Apoptoz Programlı hücre ölümü apoptoz olarak bilinen bir seri ayırıcı hücresel değişiklikler ile yürütülen aktif bir işlemdir.

Bilgi İçin

Apoptoz terimi bir çiçeğin petallerinin veya bir ağacın yapraklarının düşmesini anlatan Yunanca kelimeden türetilmiştir. Bu terim inflamasyon veya yaralanma ile kaza ile ortaya çıkan hücre ölümlerinden programlı hücre ölümünü ayırt etmek için ortaya atılmıştır.

Gelişim sırasında, programlı hücre ölümü çeşitli dokularda istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynar. Örneğin, programlı hücre ölümü amfibi ve böceklerin metamorfozları sırasında larva dokularının, ayrıca el ve ayak parmaklarının oluşumu sırasında parmaklar arasındaki dokunun ortadan kaldırılmasından sorumludur. Programlı hücre ölümünün bir diğer iyi tanımlanmış örneği memeli sinir sisteminin gelişimi sırasında gözlenir. Nöronlar gereğinden fazla üretilir, ve gelişen nöronların %50'i kadarı programlı hücre ölümü ile elimine edilir. Hayatta kalan nöronlar, hücre yaşam sinyali olan büyüme faktörleri salgılayarak ve nöronal hücre ölüm programını engelleyerek kendi hedef hücreleri ile doğru bağlantılar yapılması için seçilmiş olurlar. Benzer olarak, hayvanlarda diğer birçok hücre türünün sağkalımı büyüme faktörlerine veya komşu hücreler ya da hücreler arası matriks ile ilişkilerine bağlıdır, böylece programlı hücre ölümünün dokulardaki hücreler arası ilişkinin düzenlenmesinde de önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

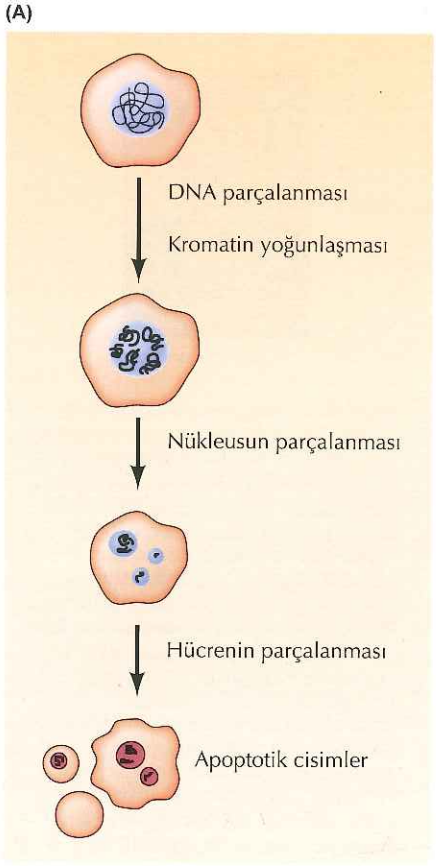
Apoptoz olayları

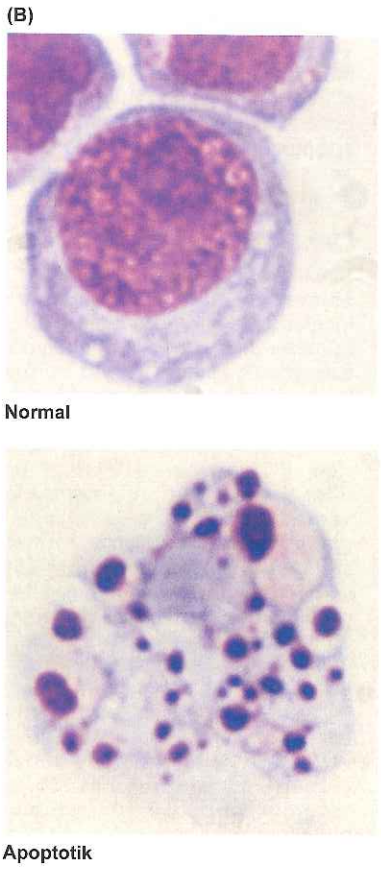
Akut yaralanmadan **(nekroz)** kaynaklanan hücrelerin kaza sonucu ölümlerinin aksine, programlı hücre ölümü ilk olarak 1972'de tarif edilen ve **apoptoz** olarak bilinen genellikle bir dizi ayırıcı hücresel değişiklikler ile devam eden aktif bir süreçtir (**Şekil 18.1**). Apoptoz sırasında, kromozomal DNA nükleozomlar arasından kesilerek parçalanır. Kromatin yoğunlaşır ve daha sonra nükleus küçük parçalar halinde kırılır. Son olarak, hücre büzülür ve apoptotik cisimler olarak isimlendirilen, membran ile kaplı parçacıklara ayrılır.

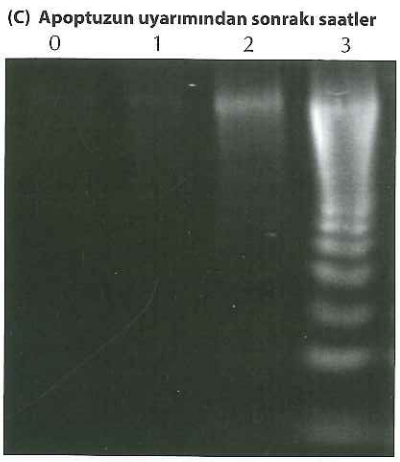
Apoptotik hücreler ve hücre fragmanları hem makrofajlar hemde komşu hücreler tarafından etkili bir şekilde tanınır ve fagositoz ile yutulur, böylece apoptoz ile ölen hücreler hızlıca dokulardan kaldırılır. Buna karşılık, nekroz yoluyla ölen hücreler şişer ve patlar, hücre içerikleri hücreler arası alana salınır ve enflamasyona neden olur. Apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasına hücre yüzeyi üzerinde bulunan "Beni ye" sinyalleri aracılık eder. Bu sinyaller normalde plazma zarının iç yaprağında yer alan fosfatidilserinler tarafından oluşturulur (bkz. Şekil 14.2). Apoptoz sırasında, fosfatidilserin hücre yüzeyine çıkar ve fagositik hücrelerdeki özel reseptörler tarafından tanınır (**Şekil 18.2**).

C. elegans gelişimi sırasındaki programlı hücre ölümünün öncü çalışmaları apoptozun moleküler mekanizmasının anlaşılması için önemli ilk bilgileri sağlamıştır. Robert Horvitz'in laboratuvarında ki çalışmalar ile ilk kez apoptozun düzenlenmesinde ve yürütülmesinde önemli rol oynayan üç gen tespit edilmiştir. Normal nematod gelişimi sırasında, toplamda 1090 olan somatik hücrenin 131'i programlı hücre ölümü ile ortadan kalkar ve erişkin solucan 959 somatik hücreden oluşur. Bu hücrelerin ölümü oldukça özeldir, öyle ki embriyo gelişimi sırasında her zaman aynı hücreler ölürler. Bu gelişimsel özgünlüğe dayanarak, Horvitz gelişim sırasındaki bu hücre ölümünden sorumlu genlerin belirlenmesi amacı ile *C. elegans*'daki hücre ölümünün genetik analizine girişmiştir. 1986'da *C. elegans* mutagenezi ile, gelişime ait hücre ölümünde gereken iki gen tespit edildi (*ced-3* ve *ced-4*). *Ced-3* ya da *ced-4* mutasyon ile etkisizleştirildiğinde normal programlı ölümün gerçekleşmediği görüldü. Üçüncü bir gen, *ced-9*, apoptozun negatif bir düzenleyicisi olarak iş görmekteydi. *Ced-9* mutasyon ile etkisizleştirildiğinde, normalde yaşaması gereken hücreler yaşamlarına devam edemedikleri ve gelişmekte olan hayvanın ölümüne neden olan apoptoza gittikleri gözlendi. Bunun aksine, *ced-9* anormal olarak yüksek düzeyde ifade edildiğinde, normal programlı hücre ölümünün gerçekleşmediği saptandı. Daha ileri çalışmalar ile bu genler tarafından kodlanan proteinlerin, Ced-4'ün Ced-

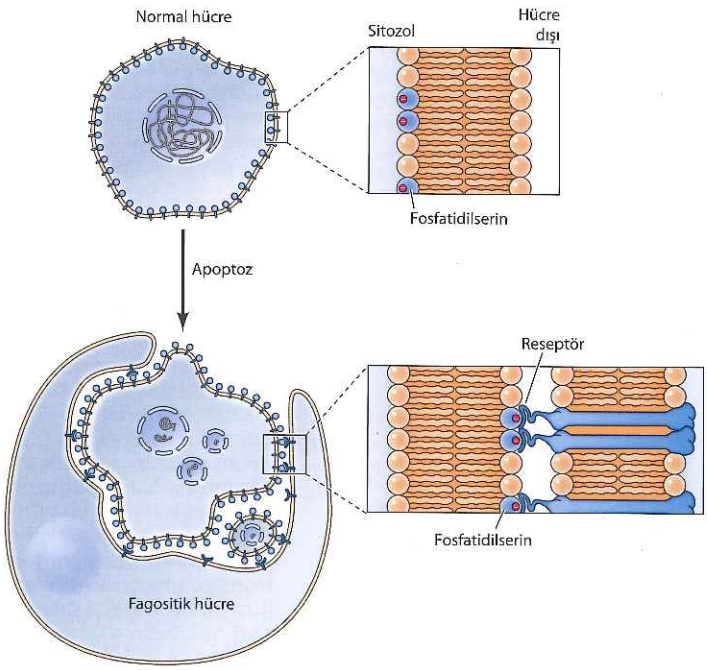
Animasyon 18.1
sites.sinauer.com/cooper7e/a18.1
Apoptoz Apotoz sırasında, kromozomal DNA genellikle parçalara ayrılır, kromatin yoğunlaşır, nükleus kırılır, hücre büzülür küçük apoptotik cisimler şeklinde parçalanır.







Şekil 18.1 Apoptoz (A) Apoptoz olayların şematik gösterimi. (B) Kromatin yoğunlaşması ve nükleus parçalanmasını gösteren normal ve apoptotik insan hücrelerinin ışık mikrografları. (C) Apoptozun uyarılmasını takip eden 0-3 saatlerinde 200 baz çiftine (nükleozom boyutu) karşılık gelen parçalara ayrılmasını gösteren apoptotik hücrelerin DNA jel elektroforezi. (B, D. R. Green Alerji & Immünoloji, La Jolla Enstitüsü'nün izniyle; C, Ken Adams, Boston Üniversitesi izniyle)



Şekil 18.2 Apoptotik hücrelerin fagositozu Apoptotik hücreler ve hücre parçacıkları fagositik hücreler tarafından tanınır ve yutulur. Fagositler tarafından tanınan sinyallerin biri hücre yüzeyinde bulunan fosfatidilserin'dir. Normal hücrelerde, fosfatidilserin plazma membranının iç yüzeyinde bulunur, ancak apoptoz sırasında hücre dış yüzeyinde yer alır.

Anahtar Deney

Programlı Hücre Ölümü İçin Gerekli Genlerin Tanımlanması

Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode *C. elegans*

Hilary M. Ellis and H. Robert Horvitz
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA

Cell, 1986, Volume 44, pages 817-829

Bağlam

1960'larda hücre ölümü, hayvan gelişimi sırasında kaderinde ölüm olan bazı özel hücrelerde dikkatli bir şekilde düzenlenen bir süreç olduğu vurgulanarak, normal bir olay olarak kabul edilmiştir. Gelişim biyolojisinde önemli bir model sistemi olarak kabul edilen basit nematod *C. elegans'ın*, programlı hücre ölümlerinin hem mekanizmasını hem de kontrolünü anlamak için anahtar olduğu kanıtlandı. 1970'lerde mikroskobik analizlerle *C. elegans* gelişiminin tüm haritası tayin edildi böylece her hücrenin embriyonik kökeni ve kaderi ortaya çıkarıldı. Daha önemlisi, *C. elegans* gelişimi, programlı hücre ölümlerinin çok özel bir modelini kapsamaktaydı. Özellikle John Sulston ve H. Robert Horvitz 1977'de erişkin kurtçukların gelişiminde (959 somatik hücreden oluşan) başlangıçta varolan 1090 hücrenin 131'inin programlı hücre ölümü ile ortadan kaldırıldığını bildirdiler. Gelişim esnasında, gelişimin bir kaderi olarak ölüme giden bu hücrelerin ölüm şeklinin normal bir olay olduğu gösterilen tüm embriyolarda aynı hücrelerin öldüğü gözlendi. Bu ölen hücrelerin hepsinin benzer bir dizi morfolojik değişiklikler geçirdiği ayrıca dikkat çekiciydi, bu programlanmış hücre ölümlerinin ortak bir mekanizma ile meydana geldiği ileri sürüldü.

Bu düşüncelere dayanarak, Horvitz *C. elegans* gelişimi sırasında programlı hücre ölümünün mekanizması ve düzenlenmesini tanımlamak amacı ile bir dizi genetik analiz yaptı. 1986'daki yayınlarında bildirdikleri deneylerinde, Hilary Ellis ve Horvitz 1986'daki yayınlarında, nematod gelişimi sırasında gerçekleşen tüm programlı hücre ölümleri için gerekli iki gen tespit ettiklerini bildirdiler. Bu genlerin belirlenmesi ve tanımlanması, apoptozun moleküler biyolojisinin anlaşılmasına yol açan önemli bir ilk adımdı.

Deneyler

*C. elegans'*ta programlı hücre ölümü geçiren hücreler mikroskobik inceleme ile son derece refraktil hücreler olarak tespit edilebiliyordu. Bu nedenle Ellis ve Horvitz normal hücre ölümlerinin oluşmadığı mutant hayvanların taranmasında bu özelliği belirteç olarak kullandılar. Hücre ölümü anormallikleri görüntülenen mutantları saflaştırmak için, nematodlara DNA ile reaksiyona giren kimyasal mutajen etil metansülfonat uyguladılar. Yaklaşık 4000 solucan dölünde ölen hücreler tarandı ve beklenen hücre ölümlerinin oluşmadığı iki mutant suş bulundu (şekle bakın). Bu mutant suşların ikisi de *ced-3* olarak isimlendirilen aynı genin çekinik mutasyonlarını taşımaktaydılar. İleri çalışmalar *ced-3'*teki mutasyonların normal gelişim sırasında oluşacak 131 programlı hücre ölümünün tümünü engellediğini gösterdi.

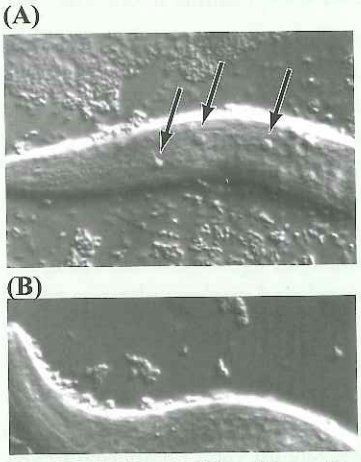
Devam eden araştırmalarla programlı hücre ölümünü engelleyen *ced-3'*e benzeyen ilave bir mutasyon belirlendi. Ancak, bu mutasyon *ced-3'*den farklı bir kromozom üzerinde bulunan başka bir gende yer almaktaydı. Bu ikinci gene *ced-4* adı verildi. *Ced-3'*deki mutasyonlara benzer şekilde *ced-4'*deki çekinik mutasyonların kurttaki tüm programlanmış hücre ölümlerini engellediği bulundu.

Etki

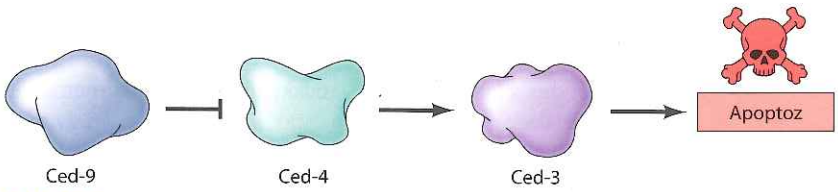
Ellis ve Horvitz tarafından *C. elegans* mutantlarının izolasyonu programlı hücre ölümünün sürecine katılan genlerin ilk genlerin tanımlanmasını sağladı. *Ced-3* ve *ced-4* genlerinin aynı zamanda *ced-9* geninin (Horvitz ve arkadaşları tarafından daha sonra bulundu) kodladığı proteinlerin, evrim süresince oldukça iyi korunmuş olan apoptozun esas düzenleyicilerinin ve yürütücülerinin prototipleri oldukları kanıtlandı. *Ced-3* geninin dizilenmesi ve klonlanması onun memeli hücrelerinde daha önce bulunan ve kaspaz ailesinin ilk üyesi olan bir proteaz ile ilişkili olduğunu ortaya

H. Robert Horvitz

çıkardı. *C. elegans ced-9* geni, ilk olarak insan B hücreli lenfomadan izole edilen, hücre çoğalmasını uyarmasından daha çok apoptozu baskılamak gibi sıradışı özelliklere sahip olan *bcl-2* onkogeni ile ilişkiliydi. Ardından *ced-4'*ün memeli Apaf-1'i ile ilişkili bir adaptör proteini kodladığı bulundu. Bu protein, kaspaz aktivasyonu için gerekliydi. Böylece *C. elegans'*da bu genlerin tanımlanması hem gelişimde hem de normal erişkin dokuların devamlılığında büyük etkileri olan apoptozun moleküler temelinin anlaşılmasına öncülük yapmıştır. Apoptozdaki anormallikler kanser, otoimmün hastalık ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere geniş bir yelpazede yer alan hastalıkların oluşumuna katıldığından dolayı, Ellis ve Horvitzin yeni ufuklar açan bulguları biyoloji ve tıp alanlarını büyük ölçüde etkilemiştir.



Normal bir kurtun (A) ve bir *ced-3* mutantının (B) fotomikrografları Ölen hücreler oldukça refraktildir ve okla gösterilmiştir (A). Bu hücreler mutant hayvanlarda bulunmazlar.

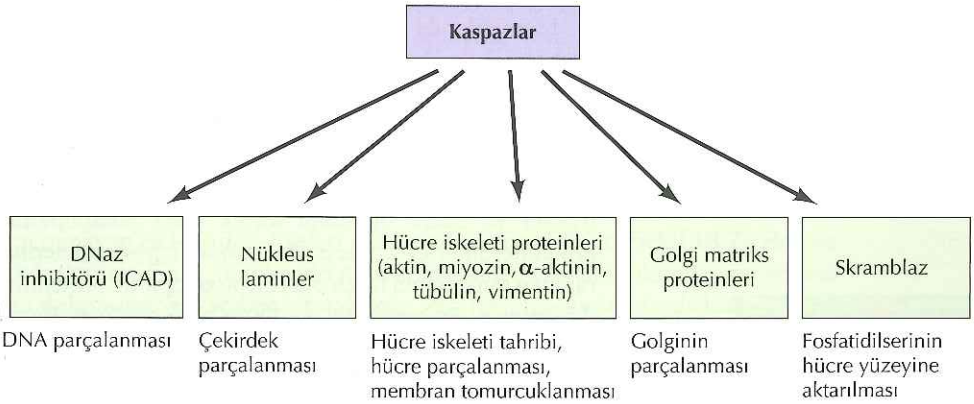


Şekil 18.3 *C. elegans* programlı hücre ölümü Genetik analizler *C. elegans* gelişimi sırasında programlı hücre ölümünde kilit rol oynayan üç gen belirlenmiştir. İki gen, *ced*-3 ve *ced*-4, hücre ölümü için gereklidir. *ced*-9 ise hücre ölümünü engeller. Ced-9 proteini Ced-3'ü aktifleştirir, Ced-4'ü baskılar.

3'ü uyarmasında, ve Ced-9'un Ced-4'ü baskılamasında iş gören bir yolakta yer aldıkları gösterildi (Şekil 18.3). *Drosophila* ve memelilerde de *ced-3, ced-4* ve *ced-9* ile ilişkili genler tanımlanmıştır ve bunların çeşitli uyaranlar tarafından tetiklenen apoptozun, korunmuş yürütücü ve düzenleyici proteinlerini kodladıkları bulunmuştur.

Kaspazlar: apoptozun işlemcileri

Ced-3 geninin moleküler klonlanması ve nükleotid dizilemesi onun bir proteaz kodladığını göstermiştir, bu apoptozun moleküler mekanizması hakkındaki ilk fikri oluşturmuştur. Bugün *Ced-3*'ün, **kaspazlar** olarak bilinen aktif bölgelerinde sistein (C) kalıntıları içeren ve proteinleri aspartik (Asp) eklentilerden kesen, bir düzineden daha fazla bir proteaz ailesinin prototipi olduğunu biliyoruz. Kaspazlar hücrede 100'den fazla farklı hedef proteinleri (Şekil 18.4) kırparak apoptozun en son işlemcileri veya programlanmış hücre ölümünün yürütücüleri olarak kabul edilir. Kaspazların önemli bir hedefi, aktifleştiği zaman çekirdek DNA'sının parçalanmasından sorumlu olan, bir DNaz inhibitörüdür. Ek olarak kaspazlar, çekirdek parçalanmasına yol açacak nükleer laminleri; hücre iskeletinin bozulmasına, plazma membranının tomurcuklanmasına (düzensiz kabarcıklanma) ve hücre parçalanmasına yol açacak olan hücre iskeleti proteinlerini; ayrıca Golgi aygıtının parçalanmasına neden olacak Golgi matriks



Şekil 18.4 Kaspaz hedefleri Kaspazlar apoptozun karakteristik morfolojik değişikliklerini ortaya çıkaracak 100'den fazla hücresel proteini keser. Kaspaz hedefleri arasında, DNaz inhibitörü (ICAD), nükleus laminleri, hücre iskeleti proteinleri, Golgi matriks proteinleri, ve plazma membranının dış yaprağına ait fosfatidilserin translokasyonunu (çevrilerek-aktarımını) gerçekleştiren skramblaz bulunmaktadır.

proteinlerini keserler. Kaspazlar ayrıca plazma membranının iç yüzünden dış yüzüne fosfatidilserini çeviren "Skramblaz"ı keser ve aktifleştirir.

Ced-3 sadece *C. elegans*'a ait kaspazdır. Ancak, *drosophila* ve memeliler *başlatıcı* ya da *efektör* (sonlandırıcı) kaspazlar olarak sınıflandırılan en az yedi kaspazdan oluşan bir aile içerirler, ve bunlar apoptoz işlemlerinin yürütülmesinde bir çağlayan işlevi içinde yer alırlar. Tüm kaspazlar diğer kaspazlar tarafından proteolitik kesim ile katalizlenerek aktif şekle dönüştürülebilen, inaktif öncüller (prokaspazlar -öncül kaspazlar) olarak sentezlenirler. Bu bölümde daha sonra açıklandığı gibi başlatıcı kaspazlar apoptoz uyarıldığında çeşitli sinyallere yanıt olarak doğrudan aktifleştirilir. Başlatıcı kaspazlar daha sonra apoptoz işlemlerine aracılık yapan hücresel hedef proteinlerin sindirilmesinden sorumlu efektör kaspazları keserler ve aktifleştirirler (bkz. Şekil 18.4). Böylece başlatıcı bir kaspazın aktivasyonu ile hücreyi ölüme götürecek kaspaz aktivasyonuna bağlı bir zincirleme reaksiyon başlar.

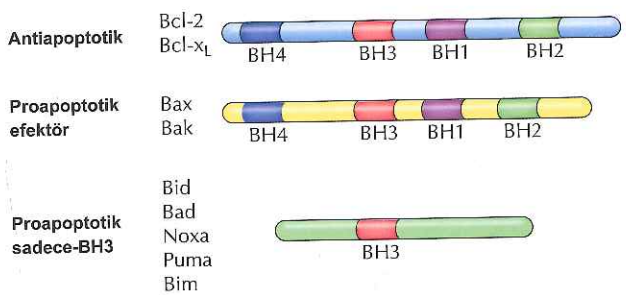
C. *elegans*'daki genetik analizler ile ilk önce Ced-4'ün, kaspaz Ced-3'ün bir aktivatörü olarak işlev gördüğü ileri sürüldü. Daha sonraki çalışmalarda, Ced-4 ve memeli homoloğunun (Apaf-1) kaspazlara bağlandığı ve onları aktifleştirdiği gösterildi. Aşağıda tartışıldığı gibi, Ced-4 ve Apaf-1, *ced-9* ile ilişkili büyük bir gen ailesi tarafından şifrelenen proteinler tarafından kontrol edilmektedir.

Apotozun esas düzenleyicileri: Bcl-2 ailesi

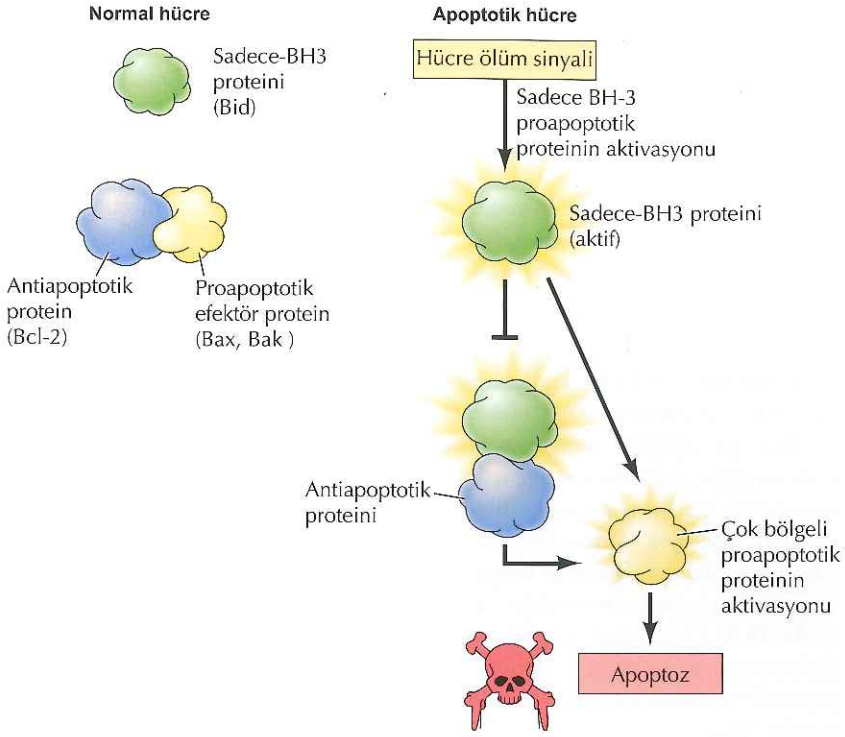
C. elegans'da programlı hücre ölümünün önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlanan üçüncü genin, *ced-9*, insan B hücreli lenfomaların (B lenfositlerinin kanserleri) gelişimine katılan, 1985 yılında önce bir onkogen olarak tanımlanan, *bcl-2* olarak isimlendirilen bir memeli geni ile ilişkili olduğu bulundu. Ras gibi, hücre çoğalmasını uyaran diğer onkogen proteinlerinin aksine (bakınız Moleküler Tıp, Bölüm 16), **Bcl-2**'nin apoptozu engellediği bulundu. Böylece Ced-9 ve Bcl-2 fonksiyonlarının benzer olduğu ve ilk kez bir apoptozun bir düzenleyicisi olarak Bcl-2'nin kanser gelişiminde hücre sağkalımındaki önemli rolüne dikkat çekildi. Bir sonraki bölümde daha ayrıntılı olarak tartışılacağı gibi, şu anda, kanser hücrelerinde genelde programlı hücre ölümünde hatalar olduğunu ve habis tümörlerin gelişiminde kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması kadar apoptoza gidememelerinin de önemli olduğunu biliyoruz.

Memeliler üç fonksiyonel gruba ayrılan, yaklaşık 20 adet Bcl-2 ile ilişkili protein ailesi kodlar (**Şekil 18.5**). Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri (antiapoptotik apoptozu engelleyen aile üyeleri) Bcl-2'nin işlevi gibi apoptoz ve programlı hücre ölümünün baskılayıcıları olarak işlev görürler. Diğer aile üyeleri ise kaspaz aktivasyonunu uyaran ve hücre ölümünü teşvik eden proapoptotik proteinlerdir. Bcl-2 ailesi ile homoloji göstermelerine rağmen fonksiyonu farklı olan bu proapoptotik proteinler iki gruptur. Proapoptotik ve diğer antiapoptotik Bcl-2 aile üyeleri Bcl-2 homoloji (BH) bölgeleri denilen dört adet korunmuş ortak bölge taşırlar. Proapoptotik aile üyelerinin efektör proteinler olarak adlandırılan bir grubu dört BH bölgesi içerir, ikinci grup ise "sadece-BH3" proteinleridir ve bir tek BH3 bölgesi içerirler.

Hücrenin yaşama veya ölme kararı proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan ve birbirini düzen-



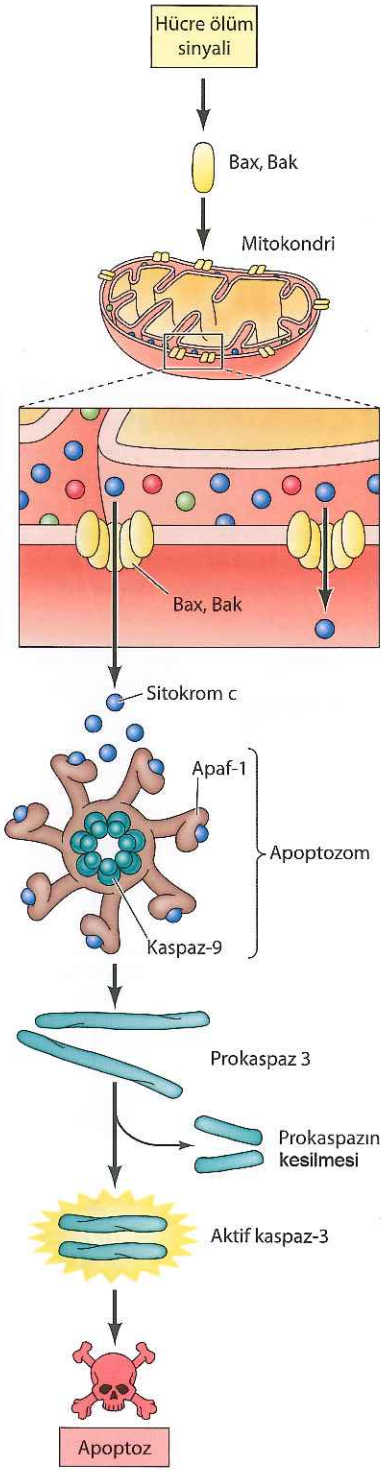
Şekil 18.5 Bcl-2 Ailesi Bcl-2 ile ilişkili protein ailesi üç fonksiyonel gruba ayrılır: Antiapoptotik proteinler (örn., Bcl-2 ve Bcl-x_L) ve proapoptotik efektör proteinler (Bax ve Bak) Bcl-2 homoloji bölgesi denilen dört adet bölge içerir (BH1-BH4). Proapoptotik "sadece-BH3" proteinleri (örneğin, Bid, Bad, Noxa, Puma ve Bim) bir tek homoloji bölgesi içerirler (BH3).



Şekil 18.6 Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki düzenleyici etkileşimler Normal hücrelerde, sadece-BH3 içeren proapoptotik proteinler (örn., Bid) etkisizdir, ve proapoptotik efektör proteinler (Bax ve Bak), antiapoptotik proteinler ile etkileşerek (örneğin Bcl-2) baskılanırlar. Hücre ölümüne yol açan Bax ve Bak'ı doğrudan aktifleştiren ayrıca antiapoptik proteinleri antagonize eden sadece-BH3 proteinleri hücre ölümü sinyalleri tarafından etkinleştirilir.

leyen bu 3 grup proteinin aktivitesi arasındaki denge ile belirlenir (**Şekil 18.6**). Proapoptotik efektör proteinler, Bax ve Bak, apoptozu doğrudan uyaran aşağı yöndeki efektörlerdir. Bunlar Bcl-2 gibi *antiapoptotik* aile üyeleri ile etkileşime girmeleri halinde baskılanırlar. Proapoptotik sadece-*BH3* ailesi üyeleri yolağın yukarı yöndeki üyeleridir, hücre ölümünü (örn., DNA hasarı) veya hücre sağ kalımını (örn., büyüme faktörleri) uyaran sinyaller ile düzenlenirler. Sadece-BH3 ailesi üyeleri aktifleştiklerinde apoptozu iki mekanizma ile başlatırlar: (1) antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini antagonize ederek ve (2) proapoptotik efektör proteinler olan Bax ve Bak'ı aktifleştirirler.

Memeli hücrelerinde programlanmış hücre ölümünün kontrolünde önemli rol oynayan Bcl-2 ailesi üyeleri mitokondride iş görürler (**Şekil 18.7**). Bax ve Bak aktifleştiğinde, mitokondri membranlar arası alanda sitokrom *c*'nin serbest bırakılmasına yol açacak, mitokondri dış membranında gözenekler (porlar) oluşturmak için oligomerize olurlar. Sitokrom *c* mitokondriden salındıktan



Şekil 18.7 Apoptozun mitokondri yolu Memeli hücrelerinde, birçok hücre ölüm sinyali mitokondri hasarı oluşturarak apoptozu uyarır. Aktifleştiklerinde, proapoptotik efektör proteinlerden Bax ve Bak mitokondri dış zarında oligomerler oluştururlar ve membranlar arasındaki sitokrom *c*'nin salınmasına yol açarlar. Sitokrom *c* salınımı Apaf-1 ve kaspaz-9'u içeren, kaspaz-9'u etkinleştiren, apoptozom oluşumuna yol açar. Kaspaz-9, sonra proteolitik kesim ile kaspaz-3 gibi aşağı-akıştaki kaspazları aktifleştirir.

Bilgi İçin

IAP'lar ilk kez konakçı hücrenin apoptozunu engelleyen viral proteinler olarak virüs ile enfekte olmuş böcek hücrelerinde tespit edilmiştir.

sonra kaspaz aktivasyonunu tetikler. Özellikle, memeli hücrelerinde anahtar başlatıcı kaspaz (kaspaz-9) **apoptozom** olarak adlandırılan bir multisubunit (çok alt üniteli) bir yapı içinde Apaf-1 ile bir kompleks oluşturarak aktifleşir. Memelide bu kompleksin oluşumu için sitokrom *c* gereklidir. Normal koşullar altındaki hücre yaşamında sitokrom *c* mitokondri membranları arasındaki alanda yerleşiktir (bkz. Şekil 12.1), buna karşılık Apaf-1 ve kaspaz-9 sitozolde bulunur, ve kaspaz-9 inaktif şekildedir. Bax veya Bak'ın etkinleşmesiyle sitokrom *c* sitozole salınır ve Apaf-1'e bağlanır, apoptozom oluşumunu ve kaspaz-9 aktivasyonunu tetikler. kaspaz-9 aktifleştiğinde, en sonunda hücre ölümüne yol açacak kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi aşağı akış yönündeki efektör kaspazları etkinleştirir.

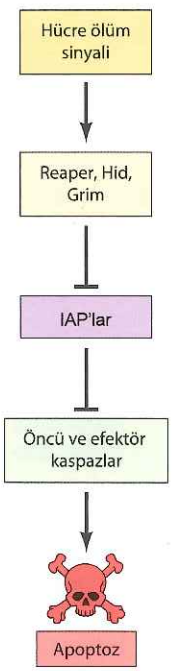
Kaspazlar da **IAP** denilen bir protein ailesi (Apoptoz baskılayıcıları) tarafından düzenlenir. IAP ailesinin üyeleri doğrudan kaspazlarla etkileşir böylece ya kaspaz aktivitesini önleyerek veya onları übikütinasyona ve proteazomda sindirilmeye hedefleyerek apoptozu baskılarlar. IAP'lar hem *Drosophila*'da hem de memelilerde (*C. elegans* hariç) bulunur, ve bunların işlevleri veya gen ifadelerinin düzenlenmesi apoptozun başka mekanizmaları tarafından sağlanır. Başlatıcı kaspazları sürekli olarak aktif olan ancak IAP'ların kontrolünde tutulan *Drosophila*'da, özellikle IAP'ların düzenlenmesi önemlidir (Şekil 18.8). Drosophila'da IAP'ları baskılayan proteinleri etkinleştirerek kaspaz aktivasyonuna yol açan ve apoptozu uyaran birçok sinyal, IAP'ları baskılayan proteinlerin etkinleştirilmesinde rol alır, böylece kaspazların aktifleşmesine yol açarlar. Memeli hücrelerinde, Bax yada Bak tarafından oluşturulan mitokondri geçirgenliği sadece sitokrom *c* salınmasına değil aynı zamanda, kaspaz aktivitesini uyarmaya yardımcı olabilen IAP inhibitörlerinin de salınmasına neden olur.

Animasyon 18.2
sites.sinauer.com/cooper7e/a18.2
Apoptoz Mitokondri Yolu Birçok hücresel stres tipi apoptozun intrinsik yolunu aktifleştitir mitokondriden sitokrom *c*'nin serbest bırakılmasına, kaspaz-9'un aktivasyonuna ve daha sonra hücre ölüme yol açan bir yolak.

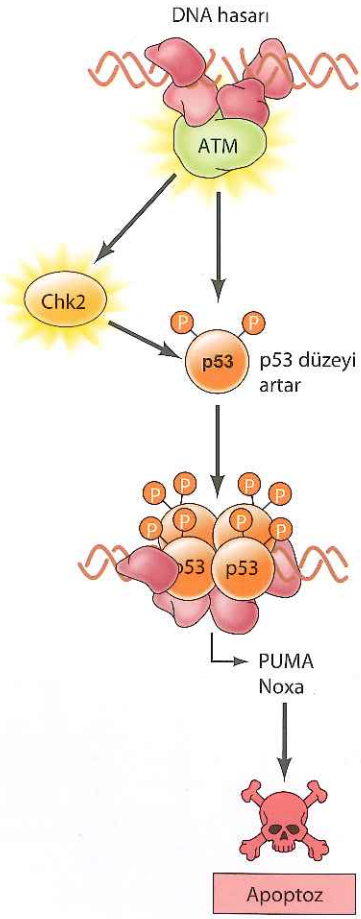
Apoptozu düzenleyen sinyal yolları

Programlı hücre ölümü, bazıları hücre ölümünü uyarma görevinde olan bazıları ise hücre yaşamını destekleme görevinde olan çeşitli sinyal yollarının bağlantılı aktiviteleri ile düzenlenir. Bu sinyaller, herbir hücrenin kaderini kontrol ederler, böylece hücrelerin hayatta kalması ya da ortadan kaldırılması, bir bütün olarak organizmanın ihtiyaçlarına göre belirlenir. Memeli hücrelerinde apoptozu uyaran yollar, Bcl-2 ailesi proteinlerinin katılımlarına ve hücre ölümünü başlatan kaspazın tipine göre *intrinsik* (hücre içi kaynaklı) veya *ekstrinsik* (hücre dışı kaynaklı) yollar olarak gruplandırılır. Hücre içi kaynaklı yol DNA hasarı ve hücre stresi tarafından etkinleştirilirken, hücre dışı kaynaklı yol, diğer hücrelerden gelen sinyaller tarafından etkinleştirilir.

Apoptozun önemli bir rolü, zarar gören hücrelerin ortadan kaldırılmasıdır, yani apoptoz DNA hasarı, viral enfeksiyon, ve büyüme faktörü yoksunluğu dahil olmak üzere çeşitli hücre stresleri tarafından uyarılır. Bu uyarıcılar mitokondriden sitokrom *c* salınmasına ve kaspaz-9 aktivasyonuna yol açan apoptozun hücre içi yolağını aktifleştirir (bkz. Şekil 18.7). Bir sonraki şekilde gösterildiği gibi, bu yolu aktifleyen çeşitli sinyaller Bcl-2 ailesinin sadece-BH3 üyelerinin düzenlemesinde bir arada çalışırlar.



Şekil 18.8 *Drosophila*'da kaspazların IAP'lar tarafından kontrolü *Drosophila*'da apoptozu uyaran sinyallerin çoğu kaspaz aktivasyonu ile sonuçlanan, IAP'ları baskılayan bir protein ailesinin üyelerini (Reaper, Hid ve Grim) aktifleştirmede görev alırlar. Hem başlatıcı hem de efektör kaspazlar IAP'lar tarafından engellenir.



Şekil 18.9 DNA hasarı ile uyarılabilen apoptozda p53'ün rolü DNA hasarı, p53 seviyelerinde hızlı artışlara neden olan, p53'ü fosforilleyen ve dengeleyen ATM ve Chk2 protein kinazların aktivasyonuna yol açar. P53 proteini daha sonra hücre ölümüne yol açan proapoptotik sadece-BH3 proteinlerinden PUMA ve Noxa kodlayan genlerin transkripsiyonunu aktifleştirerek hücre ölümüne yol açar.

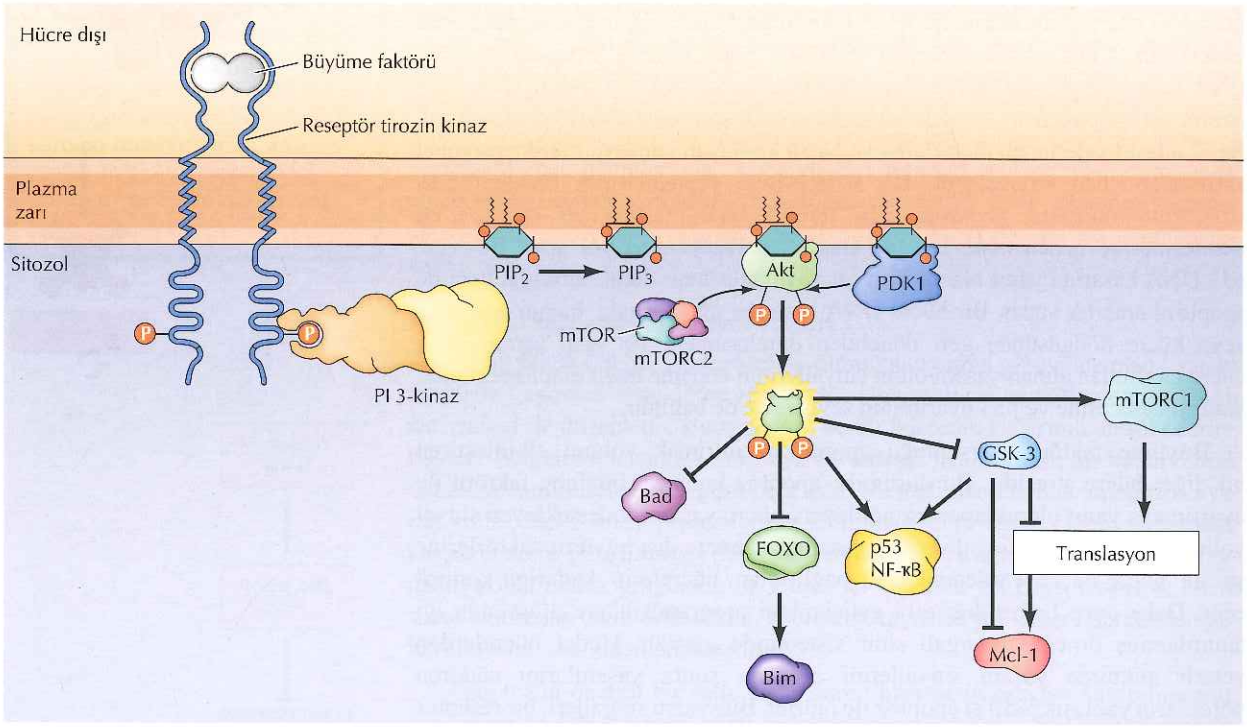
DNA hasarı, hücre stresinin özel tehlikeli bir şeklidir, çünkü hasarlı genomlara sahip hücreler uğradıkları mutasyonlardan dolayı kanser gelişimine yol açabilirler. DNA hasarı, potansiyel olarak zararlı mutasyonları taşıyan hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan, programlı hücre ölümünün başlıca tetikleyicilerinden birisidir. Bölüm 17'de belirtildiği gibi, hasarlı DNA'ya yanıt olarak hasarın tamir edilmesine zaman kazandırmak için, birtakım hücre döngü kontrol noktası, hücre döngüsünün ilerlemesini durdurur. Memeli hücrelerinde, DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünde duraksamaya neden olan başlıca yolağa transkripsiyon faktörü **p53** aracılık eder. DNA hasarı ile aktifleşen ATM ve Chk2 protein kinazlar, p53'ü fosforiller ve dengeler. p53'deki artış, p53'ün hedef genlerinde transkripsiyonel aktivasyona yol açar. Bunlardan biri, G fazındaki hücre döngüsünün ilerlemesi durduran, Cdk2 / siklin E komplekslerini baskılayan, CDK inhibitörü p21'dir (bkz. Şekil 17.20). Bununla birlikte, DNA hasarı ile p53'ün aktivasyonu apoptoza da yol açabilir (**Şekil 18.9**). p53 tarafından apoptozun uyarılması, en azından bir kısmı, sadece-BH3 proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinden olan Puma ve Noxa kodlayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonundan kaynaklanır. Bu sadece-BH3 proteinlerinin ifadelerindeki artış, mitokondriden sitokrom *c*'in serbest bırakılmasına ve kaspaz-9'un aktifleşmesine neden olan, Bax ve Bak'ın aktivasyonuna yol açar. Böylece, p53 DNA hasarına yanıt olarak hem hücre döngüsünün duraksamasına hem de apoptoza aracılık yapar. Bir hücre DNA hasarına uğradığında, bunun apoptoza veya hücre döngüsünde geri dönebilen duraksamaya yol açıp açmayacağı, hücre tarafından alınan yaşam/ölüm sinyallerinin etkisine bağlı olabileceği gibi, hasarın derecesine ve p53 uyarımının seviyesine de bağlıdır.

Büyüme faktörü yoksunluğu apoptozun intrinsik yolunu etkinleştiren bir diğer hücre stresidir. Bu durumda, apoptoz kontrolü büyüme faktörü ile uyarılmaya yanıt olarak apoptozu önleyen, hücre yaşamını destekleyen sinyal yolları ile yapılır. Bu sinyal yolları, yaşamaları hücre dışı büyüme faktörlerine ya da hücre-hücre etkileşimlerine bağlı olan hücrelerin kaderini kontrol eder. Daha önce belirtildiği gibi gelişimdeki programlı hücre ölümünün iyi tanımlanmış örneği, omurgalı sinir sisteminde görülür. Hedef hücrelerden yeterli miktarda yaşam sinyallerini aldıktan sonra yaşamlarını sürdüren nöronların yaklaşık %50'si apoptoz ile ölürler. Bu yaşam sinyalleri, bir reseptör protein tirozin kinaz tarafından aktifleştirilen, sinir hücresinin hem yaşamasını hemde farklılaşmasını uyaran, sinir büyüme faktörü (NGF) ile ilişkili polipeptit büyüme faktörleridir. Diğer hücre tipleride benzer şekilde, integrinlerle ilişkili reseptör-olmayan tirozin kinazları aktifleştiren büyüme faktörlerine ve hücre bağlantılarına bağımlıdırlar. Aslında, daha yüksek hayvanlarda diğer hücrelerden gelen yaşam sinyalleri ile hücre ölümü aktif olarak bastırılmadığı takdirde, çoğu hücreler apoptoza gitmek üzere programlanmıştır.

Hücre yaşamını desteklemekten sorumlu başlıca hücre içi sinyal yollarından birisi, tirosin kinazlar ya da G-proteine bağlı reseptörler tarafından etkinleştirilen **PI 3-kinaz** enzimi ile başlatılır. PI 3–kinaz, protein-serin/treonin kinaz **Akt**'yi aktifleştiren PIP_3'ü oluşturmak üzere zar fosfolipidi olan PIP_2'yi

fosforiller (bkz. Şekil 16.32). Daha sonra Akt apoptozu düzenleyen bir dizi proteini fosforiller (**Şekil 18.10**). Akt için anahtar substrat, Bad olarak isimlendirilen sadece-BH3 grubundan proapoptotik Bcl-2 ailesi üyesidir. Akt'nin Bad fosforilasyonu inaktif haldeki Bad'ı toplayan, 14–3–3 şaperon proteini için bir bağlama bölgesi oluşturur, böylece Bad'ın fosforilasyonu apoptozu baskılar ve hücre yaşamını destekler. Benzer olarak Bad, Ras/Raf/MEK/ERK yolu da dahil olmak üzere başka büyüme faktörü kaynaklı sinyal yollarındaki protein kinazlar tarafından da fosforillenir, yani Bad hücre yaşamına aracılık yapan büyüme faktör sinyalleşmesinde bir düzenleyici olarak iş görür.

FOXO transkripsiyon faktörlerini içeren Akt'nin diğer hedefleri de hücre canlılığında önemli rol oynarlar. Akt tarafından FOXO'nun fosforilasyonu, sitoplazmada inaktif bir şekilde bulunan FOXO'nun fosforilasyonu 14-3-3 proteinler için bir bağlama bölgesi oluşturur (bkz. Şekil 16.33). Büyüme faktörü sinyalinin ve Akt aktivitesinin yokluğunda, FOXO 14-3-3' den ayrılır, sadece-BH3 proteinlerinden Bim'i şifreleyen gen dahil olmak üzere proapoptotik genlerin transkripsiyonunu uyarmak üzere çekirdeğe gidip yerleşir. Akt ve alt

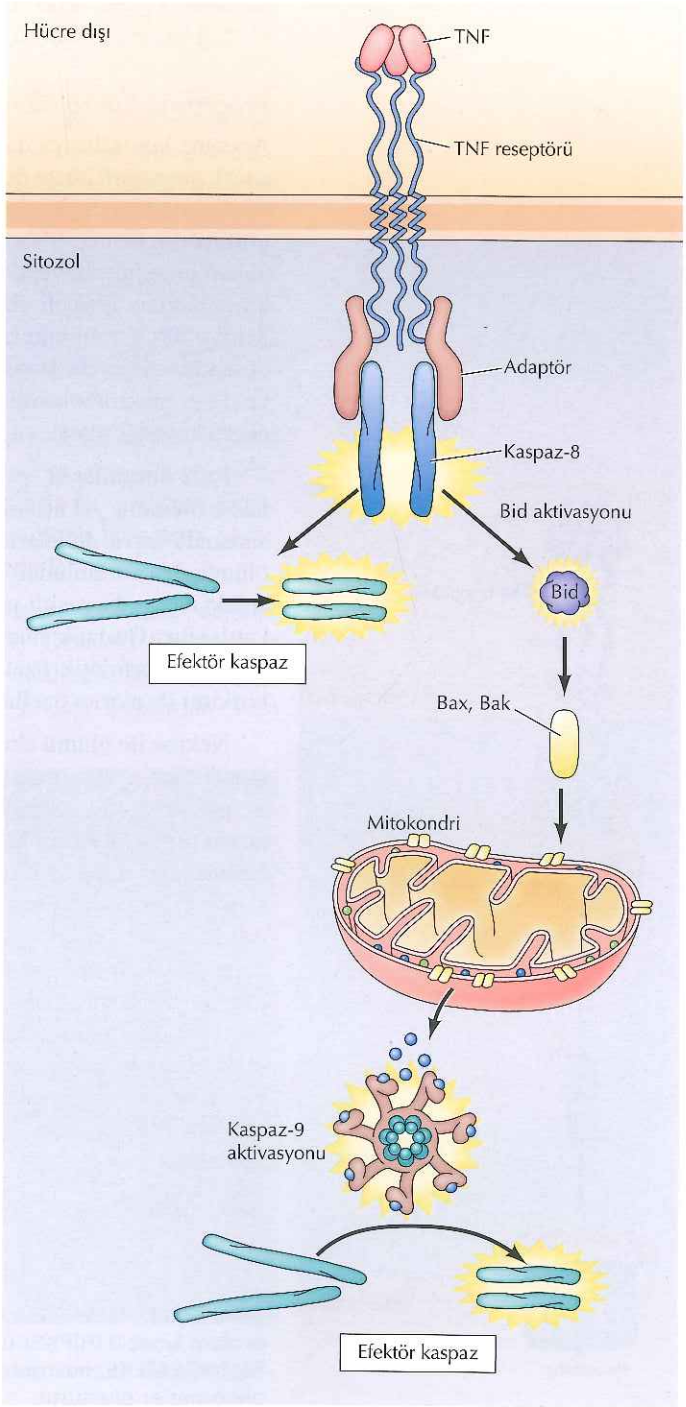


Şekil 18.10 PI 3-kinaz yolu ve hücre yaşamı Hücre yaşam sinyalleri olan birçok büyüme faktörü PI 3-kinazın aktivasyonuna, PIP_3 oluşumuna ve protein kinaz Akt'nin aktifleşetirilmesine yol açan reseptör tirosin kinazları etkinleştirirler. Akt, sonra hücre yaşamına katılan bir dizi proteinleri fosforiller. Sadece-BH3 proteini Bad'ın fosforilasyonu FOXO transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunda olduğu gibi, onu etkisiz bir durumda tutar. Akt sinyalleşmesinin yokluğunda, Bad apoptozu uyarır ve FOXO da bir diğer proapoptotik sadece-BH3 proteinlerden Bim'in transkripsiyonunu uyarır. Akt'nin ek hedefleri proapoptotik protein kinaz GSK-3, ayrıca p53 ve NF-κB gibi transkripsiyon faktörleridir. GSK-3 ile fosforillenerek yapısı bozulan, ayrıca GSK-3 ve mTORC1 (bkz. Şekil 16.34) tarafından translasyonel kontrol altında tutulan anti-apoptotik protein Mcl-1'de hücre yaşamını etkiler.

akışındaki hedefi GSK-3, Bcl-2 ailesi üyelerinin ifade edilmesini kontrol eden p53 ve NF-κB dahil olmak üzere hücre sağkalımında rol alan diğer transkripsiyon faktörlerini düzenler. Ayrıca, Mcl-1, GSK-3 tarafından übikütinasyon ve parçalanma için hedeflenen antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi Mcl-1'in düzeyi de hem GSK-3 hemde mTOR yolu tarafından translasyonel düzenlenmeyle ayarlanır (bkz. Şekil 16.34). Bcl-2 ailesi üyeleri üzerindeki bu çoklu etkiler, büyüme faktörü uyarılmasına tepki olarak kaspaz-9 aktivasyonunu ve hücre sağkalımını düzenleyen apoptozun hücre içi kaynaklı yolunun düzenlenmesinde bir arada çalışır.

Apoptozun hücre iç kaynaklı yolunu düzenleyen hücre stresi ve büyüme faktörü sinyalleşme yollarının aksine, bazı salgılanan polipeptidler apoptozun hücre dışı kaynaklı yolunu kullanarak, hücre ölümünü uyaran reseptörleri aktifleştirir. Bu reseptörler doğrudan ayırıcı bir özelliğe sahip başlatıcı kaspazı, kaspaz-8, etkinleştiririr (**Şekil 18.11**). Bu yol ile hücre ölüm işareti veren polipeptidler **tümör nekroz faktörü (TNF)** ailesine aittir. Bunlar, çeşitli hücre tiplerinde apoptoza neden olabilen TNF reseptör ailesi üyelerine bağlanırlar. Bu ailenin en iyi tanımlanmış üyelerinden biri, bağışıklık yanıtında hücre ölümünün kontrolünde önemli rolü olan Fas olarak adlandırılan hücre yüzeyi reseptörüdür. Örneğin, Fas aktivasyonunu ile uyarılan apoptoz, bağışıklık yanıtının sonunda fazla lenfositlerin ortadan kaldırılmasının yanı sıra, virüsle enfekte olmuş hücreler veya kanser hücreleri gibi, bağışıklık sisteminin hedefi olan hücrelerin ortadan kaldırılmasından da sorumludur.

TNF ve ilişkili aile üyeleri, üç özdeş polipeptit zincirinden oluşur, ve bağlandıklarında reseptörün üçlü yapısının oluşmasını uyarırlar. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, diğer uçları kaspaz-8'e



Şekil 18.11 Hücre ölüm reseptörleri TNF ve diğer hücre ölüm reseptör ligandları üç polipeptit zincirinden oluşur, bu nedenle kendi ölüm reseptörlerine bağlandıklarında reseptör trimerizasyonunu (üçlü yapı) uyarırlar. Kaspaz-8 reseptörlere doğru toplanır ve aracı moleküller ile uyarılır (apoptozun hücre dışı kaynaklı yolu). Aktifleşen kaspaz-8, doğrudan efektör kaspazları keser ve etkinleştirir. Buna ek olarak, aktif kaspaz-8 apoptozun mitokondri yolunu etkinleştiren ve kaspaz-9 aktivasyonuna yol açan sadece-BH3 proteini olan Bid'i keser (bkz. Şekil 18.7).

Video 18.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v18.2
Fas Aktivasyonu İle Uyarılan Apoptoz Hücre yüzeyi reseptörü Fas bağışıklık sisteminde hücre ölümünün kontrolünde önemli bir rol oynar.

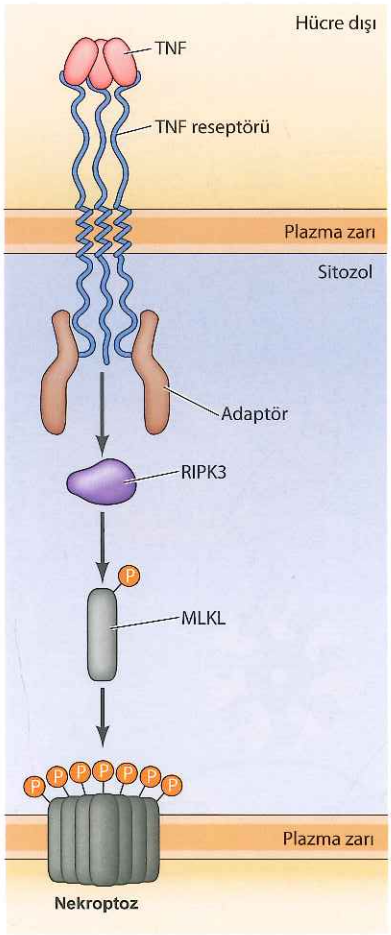
bağlanan adaptör moleküllerine bağlanır. Bu işlem, kaspaz-8 aktivasyonuna, daha sonra da aşağı akış yolunda yer alan efektör kaspazların kesilmesine ve aktifleşmesine yol açar. Bazı hücrelerde, kaspaz-8 aktivasyonu ve bunu takiben kaspaz-3 ve -7 aktivasyonu apoptozun doğrudan uyarılması için yeterlidir. Bununla beraber diğer bazı hücreler de, ölüm sinyalin çoğaltılması gereklidir. Bunun için, kaspaz-8 proapoptotik sadece-BH3 proteini olan Bid'i keserek etkinleşmesine, mitokondri geçirgenliğine ve kaspaz-9 aktivasyonuna yol açar, böylece arttırılmış kaspaz şelalesi hücre ölüm reseptörlerinin kaspaz-8'i doğrudan aktifleştirmesi ile başlatılmış olur.

Programlı hücre ölümünün alternatif yolakları

Apoptoz kontrollü ya da programlı hücre ölümünün en sık rastlanan şeklidir, ancak programlı hücre ölümü apoptotik olmayan alternatif mekanizmalar ile de ortaya çıkabilir. Bu kontrol edilebilir hücre ölümünün alternatif yolların birisi de **otofaji**'dir. Bölüm 9'da tartışıldığı gibi otofaji, veziküller (otofagozom) içine alınan proteinlerin veya organellerin, lizozomlar ile kaynaştıktan sonra hücre bileşenlerine dereceli olarak geridönüşümü sağlayan bir mekanizmadır (bkz. Şekil 9.48). Otofajinin bir rolü de besin yokluğu koşullarında hücre yaşamını desteklemektir. Bu koşullar altında otofaji aktivasyonu hücresel proteinlerin ve diğer makromoleküllerin yıkılımlarında artışa yol açar, onların bileşenleri enerji kaynağı olarak veya temel fonksiyonlar için yeniden kullanılır.

Bazı durumlarda, otofaji hücrenin temel bileşenlerini ortadan kaldırarak hücre ölümüne yol açabilir. Otofaji ve apoptoz gibi *Drosophila*'da metamorfoz sırasında larva dokularının ortadan kaldırılmasını sağlayan programlı hücre ölümünden sorumludur. Memelilerde ilaç uygulamaları veya bazı virüsler ile enfeksiyon gibi çeşitli patolojik koşulların uyardığı hücre ölümüne otofajide katılabilir. Otofajik hücre ölümü, kaspazlara gerek duymaz, ve apoptozun belirgin morfolojik özelliklerinden farklı olarak, ölen hücreler lizozomların birikimi ile ayırıcı özellik gösterirler.

Nekroz ile ölümü akut yaralanma sonucu kontrolsüz hücre parçalanmasını temsil eder, ayrıca programlı bir hücresel yanıtta olabilir. Kontrolsüz nekrozun aksine, kontrollü nekrotik hücre ölüm tipi (**nekroptoz**) enfeksiyon veya DNA hasarı gibi uyaranlara karşı programlı bir yanıt olarak başlatılır. Bu koşullarda altında, eğer apoptoz oluşmaz ise nekroptoz hücre ölümü için alternatif bir yol sağlar. Örneğin, TNF reseptörünün uyarılması apoptozun yanı sıra nekroptoz ile de hücre ölümüne yol açar. Kaspaz-8 aktivasyonu ile apoptozun uyarılmasına ek olarak (bkz. Şekil 18.11). TNF reseptörünün uyarılması aynı zamanda reseptör etkileşimli protein kinaz-3 (RIPK3)'ün aktivasyonuna ve onun substratı MLKl proteinin fosforilasyonuna da yol açar (**Şekil 18.12**). Fosforillenmiş MLKL, plazma zarını bozan oligomerler oluşturarak nekroptozda yolağında önemli bir protein olarak iş görür. Nekroptoz enflamasyonda önemli bir rol oynadığı görülür, enflamasyon ve doku hasarına bağlı çeşitli hastalıkların oluşumuna katılabilir.



Şekil 18.12 Nekroptoz TNF reseptörünün aktivasyonu, reseptör etkileşimli protein kinaz-3 (RIPK3)'ün uyarılmasına ve MLKL fosforilasyonuna yol açar. Fosforile MLKL, nekroptoz ile hücre ölümüne yol açan plazma zarını bozan oligomerler oluşturur.

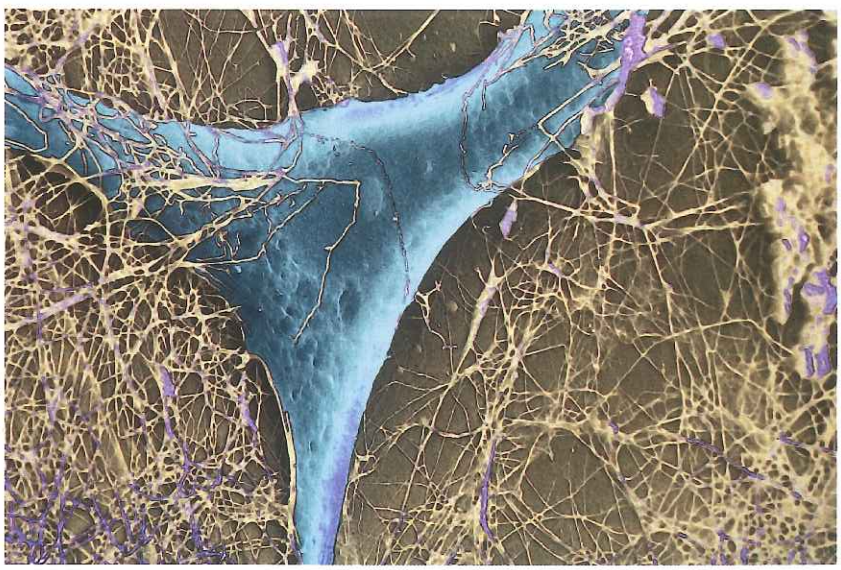
Kök Hücreler ve Erişkin Dokuların Korunması

Erken gelişim, erişkin doku ve organların özel hücrelerini oluşturmak için farklılaşan embriyonik hücrelerin hızlı çoğalması olarak tanımlanır. Hücreler farklılaştıkça, bunların çoğalma hızı genellikle azalır, ve erişkin hayvanlarda çoğu hücreler, hücre döngüsünün G_0 aşamasında duraklar. Bununla birlikte, hücreler hayatları boyunca ya yaralanma ya da programlı hücre ölümü ile yok olurlar. Erişkin dokularda ve organlarda hücre sayısını sabit sayıda tutmak için, hücre ölümü ile hücre çoğalması dengelenmelidir. Bu dengeyi korumak için, çoğu dokular ölenlerin yerine gerektiği kadar hücre koymak için çoğalmaya yetenekli hücreler içerir. Bu dengeyi korumak için dokuların çoğu, ölen hücreler kadar hücre çoğaltabilen hücrelere sahiptir. Ayrıca, erişkin hayvanlarda yüksek oranda yenilenen hücrelere sahip bazı dokularda, hücrelerin bir grubu yaşamları boyunca sürekli bölünürler. Böylece hücre ölümü ve hücre yenilenmesi, erişkin doku ve organları uygun büyüklükte ve işlevde korumak için dikkatli bir şekilde dengede tutulur.

Farklılaşmış hücrelerin çoğalması

Erişkin hayvanlardaki farklılaşmış hücrelerin birçok tipi daha fazla çoğalma yeteneğine sahip değildir. Eğer bu hücreler yok olursa, kendini-yenileyebilen kök hücrelerden türevlenen, daha az farklılaşmış hücreler ile yer değiştirirler, bu konu bir sonraki bölümde anlatılmaktadır. Bununla birlikte, farklılaşmış hücrelerin diğer bazı tipleri, organizmanın yaşamı boyunca hasarlı doku onarımı için gerekli olan çoğalma yeteneğini korurlar. Bu hücreler hücre döngüsünün G_0 fazına girerler, fakat hasarlanmış veya ölmüş hücrelerin yerini almaları gerektiği zaman hücre çoğalmasına devam ederler.

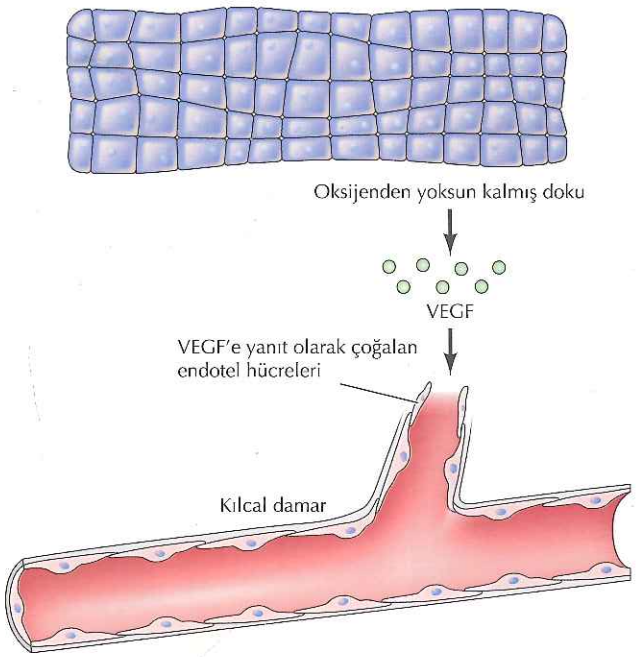
Bu tip hücrelere, kollajen salgılayan bağ dokuları içerisinde dağınık olarak bulunan fibroblastlarda dahildir (**Şekil 18.13**). Derideki fibroblastlar normalde G_0 evresinde tutulur, fakat kesilme veya yaralanma sonucu ortaya çıkan hasarların onarımına ihtiyaç duyulduğunda hızlıca çoğalırlar. Yara



Şekil 18.13 Bir deri fibroblastı Kollojen fibriller ile sarılmış bir deri fibroblastının taramalı elektron mikrofotoğrafı.

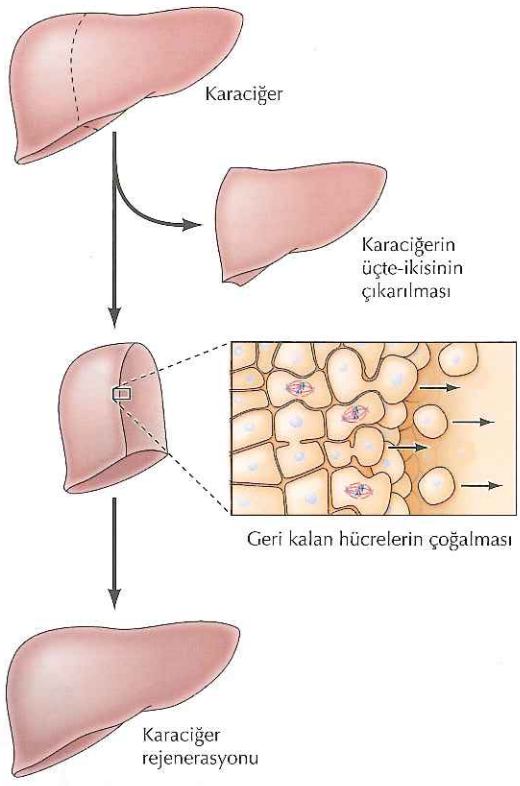
Şekil 18.14 Endotel hücreleri Bir kılcal damarın elektron mikrofotoğrafı. Kılcal damar ince bazal lamina ile çevrili tek bir endotel hücresi ile kaplıdır.

bölgesinde kanın pıhtılaşması, trombositlerden (platelet) trombosit-türevli büyüme faktörü (*platelet derived growth factor; PDGF*)'nün salınımına neden olur. Bölüm 16'te anlatıldığı gibi, PDGF hasarlı dokunun onarımına ve yeniden yapılanmasına kollajen salgıyarak katkıda bulunan fibroblastların hem çoğalmalarını hem de yara içine göçünü uyaran bir reseptör-protein kinazı aktive eder.



Kan damarlarını kaplayan endotel hücreleri (**Şekil 18.14**) çoğalma yeteneği olan bir diğer farklılaşmış hücre tipidir. Endotel hücrelerinin çoğalması, hasarlı dokunun onarılması ve yeniden yapılanması için gerekli olan yeni kan damarlarının oluşumunu sağlar. Endotel hücresinin çoğalması ve kılcal damarların oluşumu, yeni kılcalların yayılacakları dokudaki hücreler tarafından üretilen bir büyüme faktörü (vasküler endotel büyüme faktörü-VEGF) tarafından tetiklenir. Yetersiz kan dolaşımından kaynaklanan düşük oksijene maruz kalan dokular da VEGF'in üretimi oksijen eksikliği ile de tetiklenir, bu endotel hücre çoğalmasını ve yeni kılcal damarların oluşumunu uyaran bir düzenleme sistemidir (**Şekil 18.15**). Daha büyük kan damarlarının (örn., arterler) duvarlarını oluşturan, bunun yanı sıra sindirim ve solunum yolları ve diğer iç organların kasılan

Şekil 18.15 Endotel hücrelerinin çoğalması Endotel hücrelerinin çoğalması vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ile uyarılır. Yeni kılcal damarların büyümesine yol açan VEGF, yeterli kan dolaşımı olmayan dokularda, oksijenden eksikliğini yaşayan hücreler tarafından salgılanır.



Şekil 18.16 Karaciğer yenilenmesi Karaciğer hücreleri normalde G_0'da tutulur, fakat hasarlı dokunun yenilenmesi için çoğalmaya gider. Bir sıçan karaciğerinin üçte ikisi ameliyatla çıkarılırsa, geri kalan hücreler birkaç gün içinde tüm karaciğeri yenilemek için çoğalırlar.

kısımlarının duvarlarını oluşturan düz kas hücreleri de, büyüme faktörü uyarısına yanıt olarak çoğalma yeteneğine sahiptir. Bunun aksine, farklılaşmış iskelet ve kalp kası hücrelerinin bölünmesi mümkün değildir.

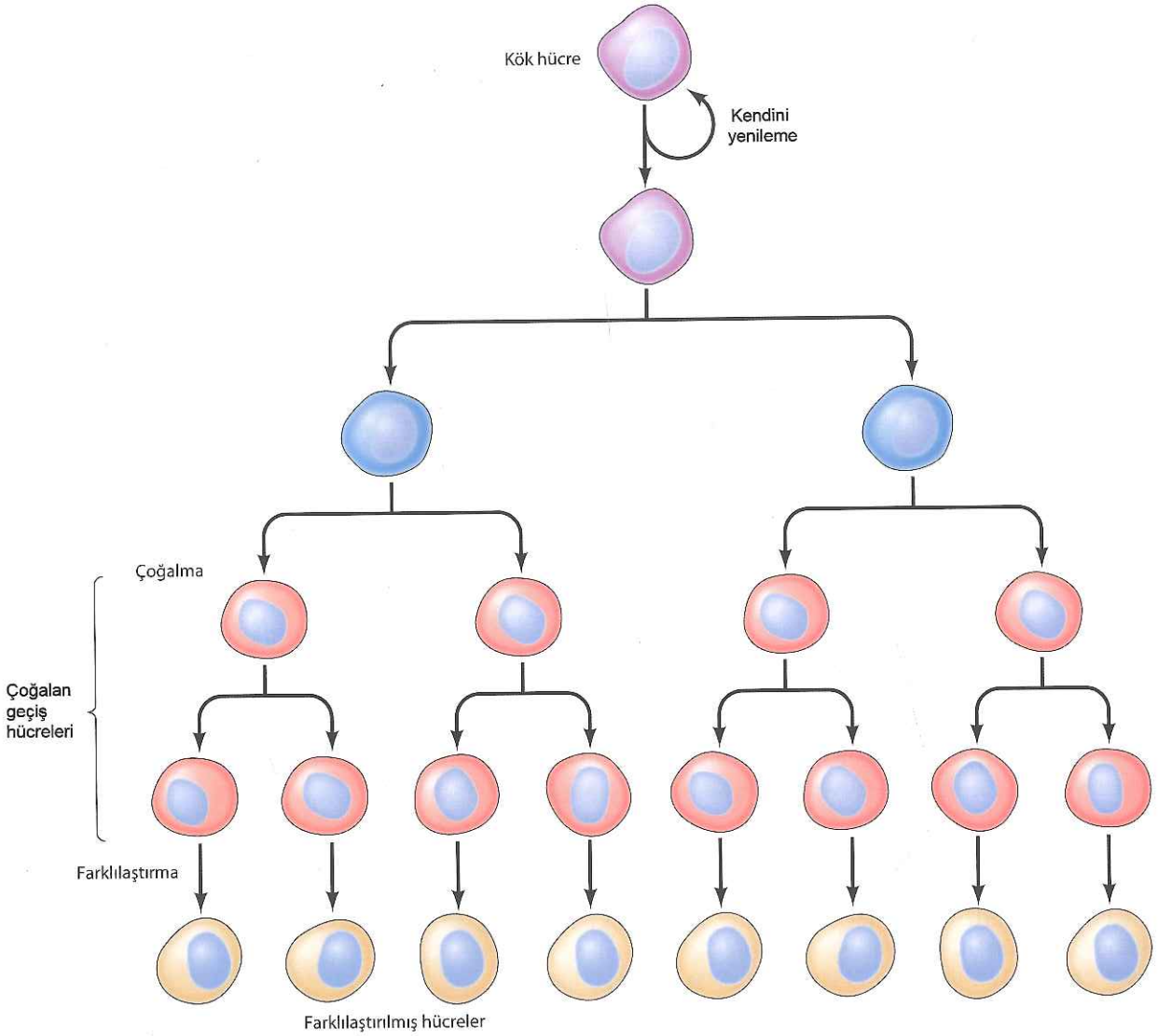
Bazı iç organların epitel hücreleri de hasarlı dokuların yenilenmesi için çoğalabilir. Çarpıcı bir örnek, normal olarak hücre döngüsünün G_0 fazında tutulan karaciğer hücreleridir. Çok büyük miktarlarda karaciğer hücresi yok olursa (örneğin, karaciğerin bir kısmının cerrahi olarak çıkarılması ile) geriye kalan hücreler, dokuda kaybolanların yerini doldurmak üzere çoğalmak için uyarılırlar (**Şekil 18.16**). Örneğin, üçte ikisi cerrahi olarak çıkarılan sıçan karaciğerinde, kalan hücrelerin hızlı çoğalmasını takiben birkaç gün içinde tüm karaciğer yenilenir.

Kök hücreler

Erişkin hayvanlarda çoğunluğu tamamen farklılaşmış hücreler artık bölünme yeteneğine sahip değildir. Bununla birlikte, bu hücreler birçok erişkin dokuda bulunan **kök hücreleri** olarak adlandırılan daha az farklılaşmış ve kendini yenileyebilen hücrelerin çoğalması ile yenilenebilirler. Bir hayvanın yaşamı boyunca çoğalma ve farklılaşmış hücrelerin yerini alma yeteneklerini koruduklarından dolayı, kök hücreler çoğu doku ve organların devamlılığında kritik bir rol oynamaktadır.

Kök hücrelerin temel özelliği, bölündüklerinde biri kök hücre olarak kalacak, diğeri bölünen ve farklılaşan hücre olacak şekilde yavru hücreler oluşturmasıdır (**Şekil 18.17**). Kök hücreler, farklılaşmadan önce birkaç bölünme geçirerek hızlıca çoğalan hücreler (çoğalan-geçiş hücreleri olarak adlandırılan bölünme potansiyeli sınırlı olan hücreler) verir, böylece kök hücre bölünmesi çeşitli farklılaşmış hücrelerin üretimine yol açar. Kök hücreler bölündüğünde yeni kök hücrelerin yanı sıra farklılaşmış yavru hücreleri de üretmesinden dolayı, kök hücreler yaşam boyu farklılaşmış hücrelerin üretilmesinde yaşam boyu bir kaynak oluşturan kendini yenileyen topluluklardır. Erişkin hayvanlarda kısa yaşam sürelerine sahip ve sürekli yenilenmesi gereken kan hücreleri, sperm, deri epitel hücreleri, ve sindirim sisteminin epitel hücreleri dahil olmak üzere çeşitli farklılaşmış hücre tiplerinde kök hücreler belirgin role sahiptir. Her durumda, tamamen farklılaşmış hücreler kendilerini çoğaltamaz; bunun yerine, farklılaşmış hücrelerin sabit bir sayıda korunması için özelleşmiş olan kök hücrelerin çoğalması ile yenilenirler. İskelet kası ve sinir sistemi dahil olmak üzere diğer çeşitli erişkin dokularında da, hasarlı dokuların yenilenmesinde iş gören kök hücreler tespit edilmiştir.

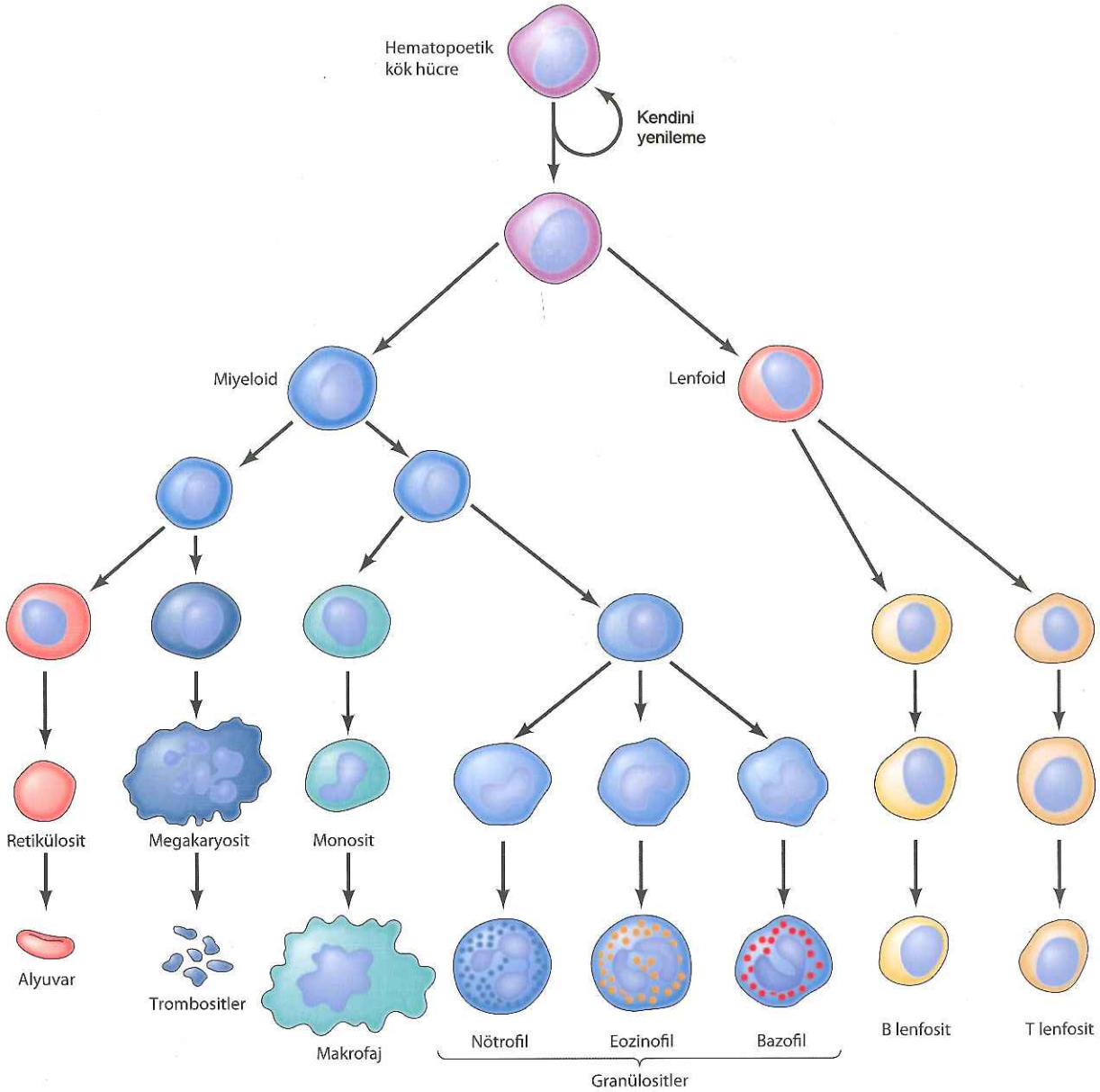
Kök hücreler ilk kez 1961'de Ernest McCulloch ve James Till tarafından, fare kemik iliğinden türevlenen tek bir hücrenin çoğaldığını ve çok yönlü farklılaşmış kan hücrelerini oluşturduğunu gösteren deneyleri ile hematopoetik



Şekil 18.17 Kök hücre çoğalması Kök hücreler bölünerek biri kök hücre olarak kalan, diğeri birkaç hücre bölünmesi geçirerek daha sonra farklılaşacak olan geçici-çoğalan hücre olmak üzere yavru hücreler oluşturur.

(kan-yapan) sistemde belirlenmiştir. Hematopoetik kök hücrelerin nitelikleri iyi ayırt edilmiştir ve kan hücrelerinin üretimi, farklılaşmış hücre popülasyonlarının devamlılığında kök hücrelerin rolünü anlamak için iyi bir örnek oluşturur.

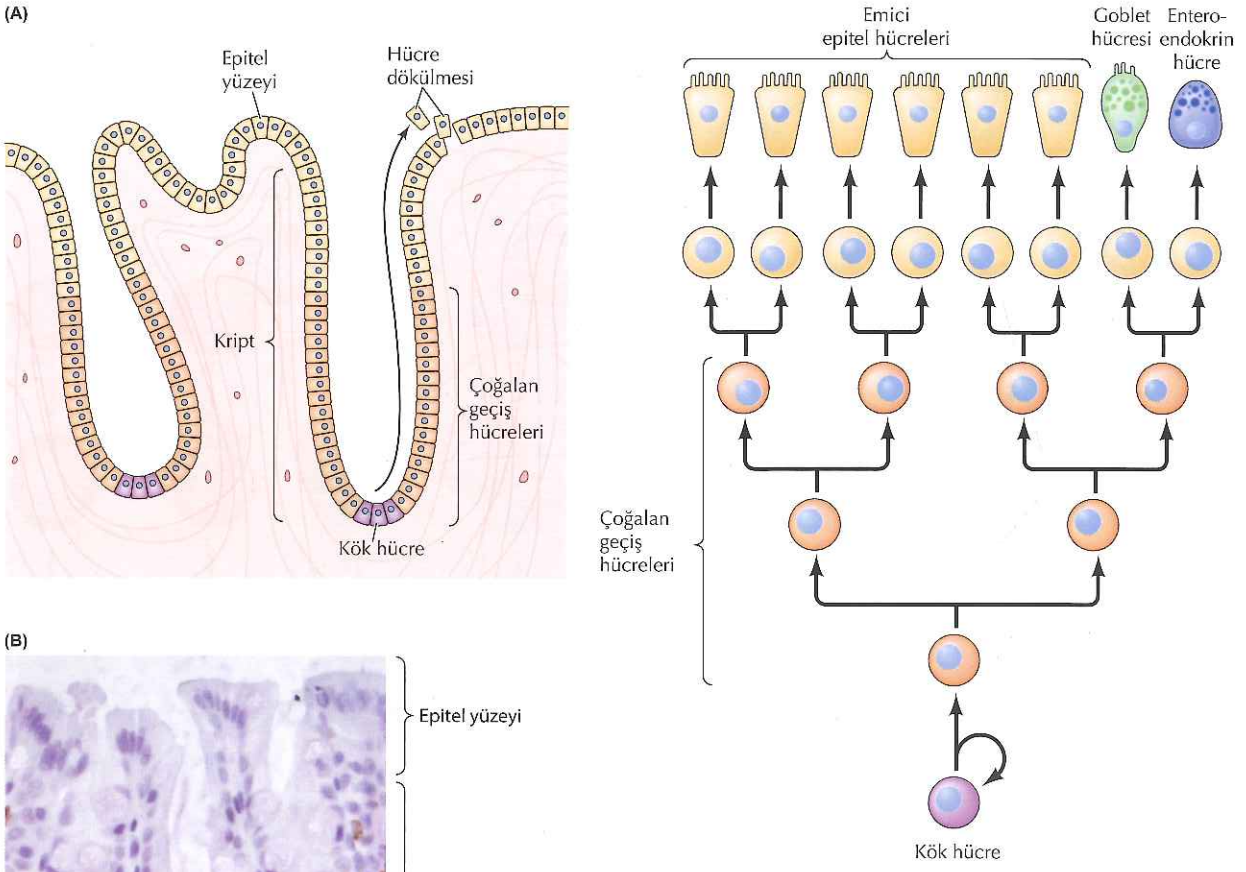
Özel işlevlere sahip kan hücrelerinin birkaç farklı tipi vardır: O_2 ve CO_2 taşınmasında iş gören eritrositler (kırmızı kan hücreleri); fagositik hücreler olan granülositler ve makrofajlar; kan pıhtılaşmasında görev yapan trombositler (megakaryositlerin parçaları); ve bağışıklık yanıtından sorumlu olan lenfositler. Bütün bu hücrelerin ömürleri bir günden birkaç aya kadar sınırlıdır ve hepsi hematopoetik kök hücrelerin aynı soyundan türevlenirler. İnsanlarda her gün 100 milyon kan hücresinden daha fazlası yok olduğundan, kemik iliği



Şekil 18.18 Kan hücrelerinin oluşumu Kan hücrelerinin farklı tiplerinin tümü kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerinden gelişir. Farklılaşmış hücrelerin öncülleri farklılaşmadan önce (gösterilmemiştir) birkaç tur hücre bölünmesi geçirir.

hematopoetik kök hücrelerinden sürekli olarak üretilmelidir (Şekil 18.18). Hematopoetik kök hücre soyları, hücre farklılaşmasını yönlendiren büyüme faktörleri tarafından belirlenen, daha önce kararlaştırılmış özel farklılaşma yolları oluşana kadar birçok bölünme geçirirler ve çoğalırlar. Tamamen farklılaştıklarında, kan hücrelerinin çoğalması durur, bu nedenle farklılaşmış kan hücre popülasyonlarının devamlılığı kendini yenileyen hematopoetik kök hücrelerinin sürekli bölünmesine bağlıdır.

Bağırsak, bir epitel dokunun kendini yenilemesinde yer alan kök hücreler için mükemmel bir örnektir. Bağırsak, besinlerin emilimi ve sindiriminden sorumlu olan tek tabakalı epitel hücreleri ile çevrilidir. Bu bağırsak epitel hücreleri olağanüstü sert bir çevreye maruzdur ve sadece birkaç günlük bir ömrü vardır, apoptoz ile ölürler, ve sindirim sistemi içine dökülürler. Dolayısıyla bağırsak epitelinin yenilenmesi yaşam boyunca devam eden bir süreçtir. Yeni hücreler, bağırsak kriptlerin alt kısmındaki kök hücrelerinden yavaş bir bölünme ile ama sürekli olarak türevlenirler (**Şekil 18.19**). Kök hücreler, kriptlerin yaklaşık üçte ikisini işgal eden ve hızlı bölünen geçici-çoğalan hücre topluluklarını üretir. Çoğalan geçiş hücreleri üç veya dört hücre bölünmesi geçirerek çoğalır, ve daha sonra kolon yüzey epitelinin üç hücre

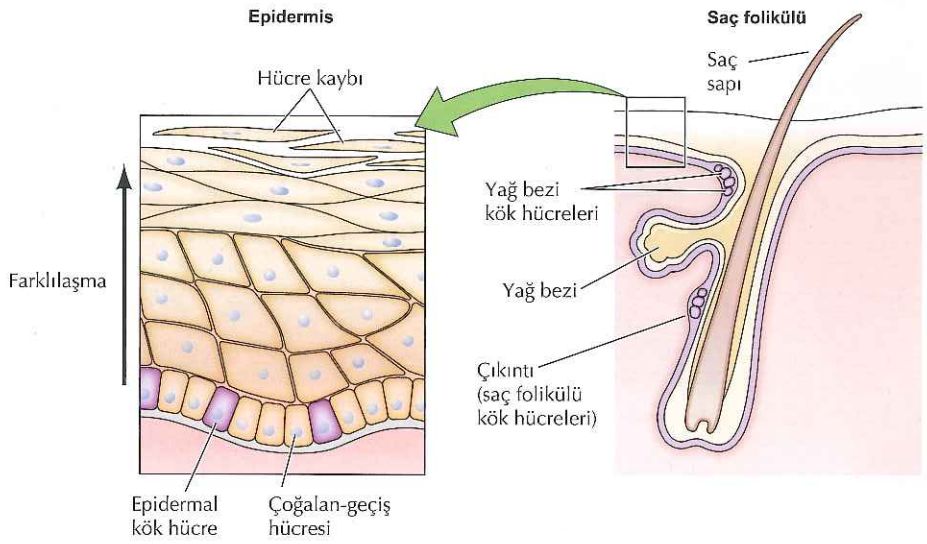


Şekil 18.19 **Bağırsak epitelinin yenilenmesi** (A) Kolon epitel hücreleri bağırsak kriptlerinin alt kısmında bulunan kök hücrelerin bölünmesiyle yenilenir. Kriptlerin yaklaşık üçte ikisini işgal eden ve yüzey epitel hücrelerinin üç tipine (emici epitel hücreleri, Goblet hücreleri ve enteroendokrin hücreleri) farklılaşmadan önce üç dört bölünme geçiren kök hücreler, çoğalan-geçiş hücre topluluklarına değişir. Yüzey epitel hücreleri sürekli apoptoz geçirir ve bağırsak lümeni içine dökülür. (B) Bir kolon kriptinin ve yüzey epitelinin mikrofotoğrafı (B). Çoğalan hücreler bir hücre döngüsü proteinine karşı oluşturulan antikor ile boyanmış çoğalan hücreler (kahverengi nükleuslar) (B, F. Radtke ve H. Clevers, 2005. *Science* 307: 1904' den alınmıştır.)

tipine farklılaşırlar: emilim yapan epitel hücreleri, ayrıca Goblet hücreleri ve enteroendokrin hücreler olarak adlandırılan iki tip salgı hücresi. İnce bağırsak, ayrıca bakterilere karşı etken maddeler salgılayan dördüncü bir hücre tipi olan Panet hücreleri içerir. Her bir kript, farklı tiplerdeki tüm bağırsak epiteli hücrelerini oluşturabilen kendini yenileyen kök hücreleri içerir.

Kök hücreler ayrıca deri ve saçın sürekli yenilenmesinden sorumludur. Bağırsak yüzeyi gibi, deri ve saç güneşten gelen ultraviyole ışınlar dahil olmak üzere zararlı bir çevre etkisi altındadır, ve yaşam boyunca sürekli yenilenmektedir. Deri üç ana hücre soyundan oluşur: epidermis, saç folikülleri ve deri yüzeyini nemlendiren yağ salgılayan yağ bezleri. Bu üç hücre topluluğu, her birinin kendine ait kök hücreleri tarafından oluşturulmaktadır (Şekil 18.20). Epidermis sürekli hücre yenilenmesi geçiren çok katlı epiteldir. İnsanda, epidermis hücreleri yüzeyden soyularak, her iki haftada bir yenilenir. Bu hücreler tek sıralı bazal tabakada bulunan epidermal kök hücreleri tarafından yenilenir. Epidermal kök hücreler önce üç ile altı arasında bölünme geçirerek önce farklılaşan, daha sonra derinin üst bölgelerine doğru taşınan geçici-çoğalan hücreleri oluşturur. Saç üretiminden sorumlu kök hücreleri, kıl folikülünün çıkıntı olarak adlandırılan bir bölgesinde bulunurlar. Çıkıntıdaki kök hücrelerinden çoğalarak ve farlılaşarak saç gövdesini oluşturan geçici-çoğalan matriks hücreleri oluşur. Ayrı bir kök hücre topluluğa yağ bezinin dibinde bulunur. Dikkat çeken konu, deri yaralandığında, çıkıntıda yer alan kök hücrelerin, hem deri hem de saç verebilen multipotent kök hücreler gibi işlev görerek epidermis ve yağ bezlerinin ortaya çıkmasına neden olabilmesidir.

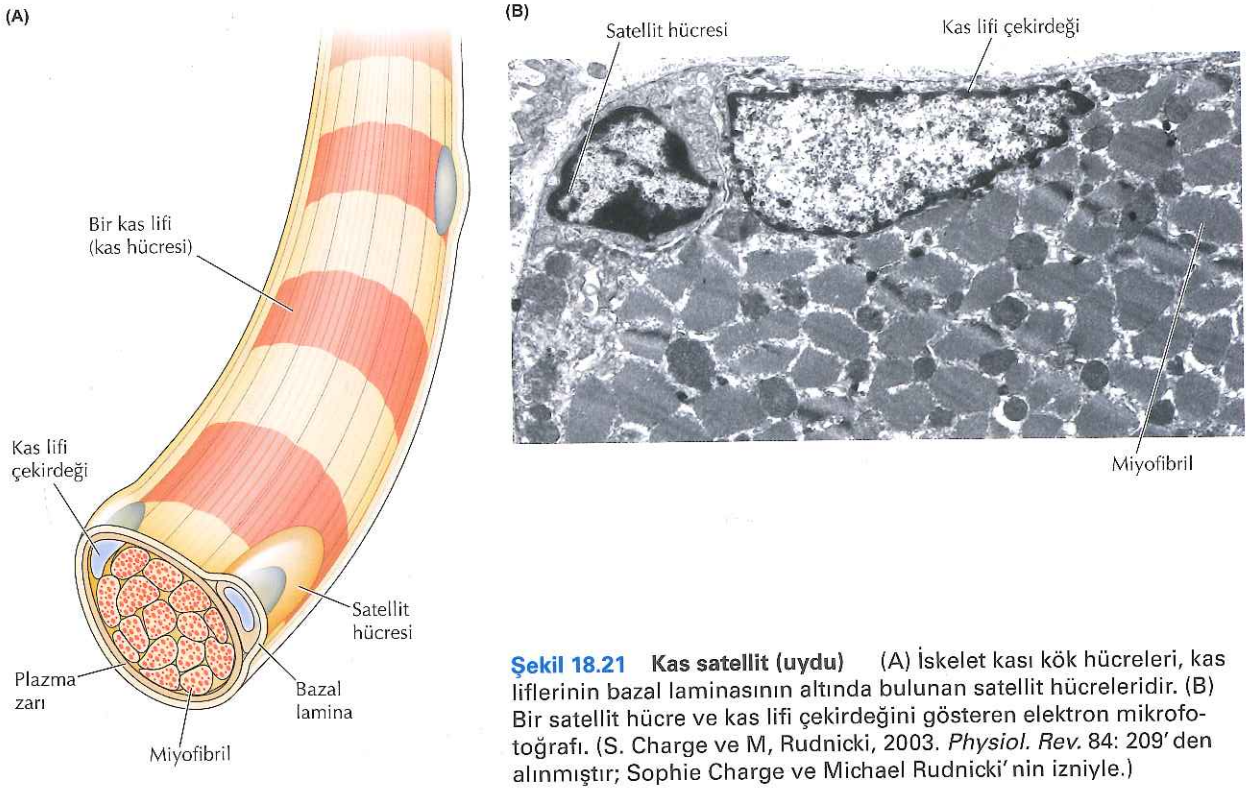
Hematopoetik sistemde, bağırsak epitelinde ve deride tanımlanan sürekli hücre yenilenmesinin aksine, iskelet kası kök hücreleri hasarlı dokuların



Şekil 18.20 Deri kök hücreleri Epidermis çok katlı epitel hücrelerinden oluşur. Yüzeydeki hücreler sürekli yok olur ve bazal tabakadaki, epidermal kök hücreleri tarafından yenilenir. Kök hücreler, farklılaşmadan ve deri yüzeyine geçmeden önce bazal tabakada birkaç bölünme geçirerek çoğalan-geçiş hücrelerini oluştururlar. Yağ bezinin kök hücreleri kendi dibinde yer alır, ve saç folikullerinin kök hücreleri ise çıkıntı denilen yağ bezinin altındaki bir bölgede yer alır.

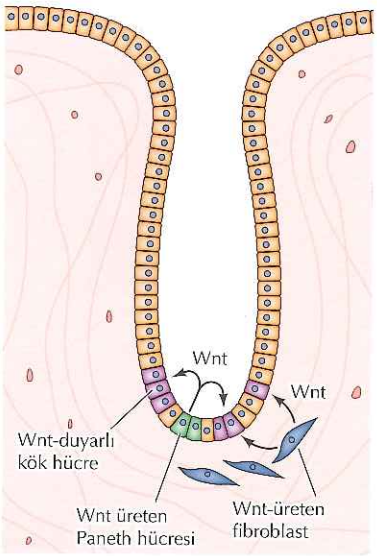
tamirindeki rolü için iyi bir örnek oluşturur. İskelet kası, gelişimi esnasında hücre kaynaşması ile ortaya çıkan çok-çekirdekli büyük hücrelerden (kas lifleri) oluşmaktadır (bkz. Şekil 13.22). İskelet kası, normalde çok az bir hücre değişimine uğrayan kararlı bir doku olmakla birlikte, yaralanma veya egzersize yanıt olarak hızlı bir şekilde yeniden üretebilmektedir. Bu yenilenme, erişkin kas kök hücreleri olan uydu hücrelerin çoğalması ile gerçekleşir. Uydu hücreleri kas liflerinin bazal laminası altında yer almaktadır (**Şekil 18.21**). Bunlar, hücre döngüsünün G_0 fazında tutulup normalde sessiz kalırlar, ancak yaralanma veya egzersize yanıt olarak çoğalmak üzere aktifleştirilirler. Uydu hücreleri, aktifleştiğinde birkaç bölünme geçiren, daha sonra farklılaşan ve kaynaşarak yeni kas lifleri oluşturan yeni hücreler verir. Yaşam boyunca, iskelet kasının devamlı yenilenme kapasitesi uydu kök hücre topluluğunun kendini-yenilemesinden kaynaklanmaktadır.

Kök hücreler beyin ve kalp gibi birçok diğer erişkin dokuda da tespit edilmiştir, ve hepsi olmasa da çoğu doku organizmanın yaşamı boyunca kaybolan hücrelerinin yerine yenisini koyabilme potansiyeline sahip kök hücreler içerir. Bu kök hücrelerin, yaşam boyu çevresel sinyaller ile kendini-yenilemeleri ve farklılaşmaları arasındaki dengeyi kontrol eden, onların kök hücreler olarak devamlılıklarını koruyan, **nişler** olarak adlandırılan, özel mikroçevreler içinde yer aldıkları anlaşılmaktadır. Ancak erişkin memeli dokularında kök hücreler nadir bulunur, bu nedenle kök hücrelerin ve nişlerinin kesin tayini kök hücre biyolojisi alanında önemli bir sorun teşkil etmektedir. Örneğin, bağırsak epitelinin korunmasında rol alan kök hücrelerin rolü uzun zamandır bilinmesine rağmen kript dibindeki bağırsak kök hücreleri ilk kez, Hans Clevers ve arkadaşlarının 2007 yılındaki çalışmaları ile tespit edilmiştir (bkz. Şekil 18.19).



Şekil 18.21 Kas satellit (uydu) (A) İskelet kası kök hücreleri, kas liflerinin bazal laminasının altında bulunan satellit hücreleridir. (B) Bir satellit hücre ve kas lifi çekirdeğini gösteren elektron mikrofotoğrafı. (S. Charge ve M, Rudnicki, 2003. *Physiol. Rev.* 84: 209'den alınmıştır; Sophie Charge ve Michael Rudnicki'nin izniyle.)

Wnt sinyal yolu (bkz. Şekil 16.42), bu kök hücrelerin çoğalma kontrolünde önemli bir rol oynar, ve komşu epitel hücreleri ve bağ dokusu içinde uzanan fibroblastlar tarafından salgılanan Wnt polipeptidleri intestinal kök hücrelerinin devamlılığından sorumludur (Şekil 18.22). Wnt sinyal yolu aynı zamanda deri ve hematopoetik sistemin kök hücreleri de dahil olmak üzere, diğer bazı kök hücrelerin düzenlenmesine de katılır. Ayrıca TGF-β, Hedgehog ve Notch sinyal yolları, hücreler arası alan ile etkileşimlerinin yanı sıra (bkz. Şekil 16.39, 16.41, ve 16.43) kök hücre düzenlenmesinde de önemli rol oynarlar, ancak kendilerine özel nişi olan kök hücrelerin farklı düzenlenmesinde bu faktörlerin kesin rollerinin ne olduğu hala bilinmemektedir.



Şekil 18.22 Bağırsak kök hücre nişi İnce bağırsağın kök hücreleri komşu Paneth hücrelerinden ve bağ dokusuna ait fibroblastlardan salgılanan Wnt polipeptidleri ile devamlılıklarını sağlar.

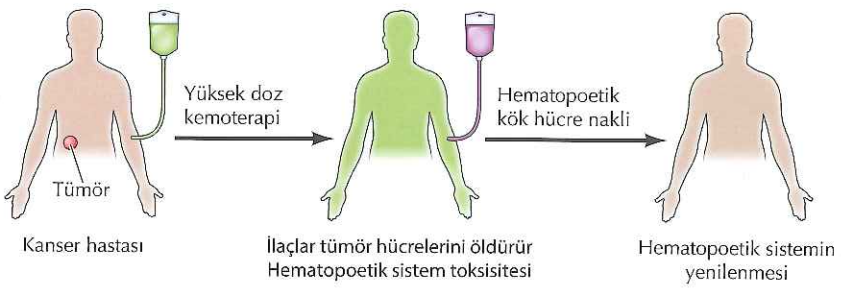
Erişkin kök hücrelerin tıbbi uygulamaları

Erişkin kök hücrelerinin hasarlı doku onarımındaki yeteneklerinden dolayı klinik tıpta etkin olarak kullanımı düşünülmüştür. Eğer bu kök hücreler saf olarak elde edilebilir ve kültür ortamında üretilebilirse, çeşitli hastalıklarda, örneğin diyabette veya kas distrofisi, Parkinson ya da Alzheimer gibi dejeneratif hastalıklarda, hasarlı dokunun yenilenmesinde ve tedavisinde kullanılabilir. Bazı durumlarda, erişkin dokulardan elde edilen kök hücrelerin kullanımı kök hücre tedavileri için uygun bir girişim olabilir, ancak embriyoya ait ya da uyarılmış pluripotent kök hücrelerin kullanımı (bu konu bir sonraki bölümde ele alınmıştır) daha geniş bir hastalık grubununun tedavisinde çok yönlü bir yaklaşım olasılığını ortaya koymaktadır.

Erişkin kök hücrelerin en iyi bilinen klinik uygulaması, çeşitli kanserlerin tedavisinde önemli bir rol oynayan **hematopoetik kök hücre nakli** (veya **kemik iliği nakli**)'dir. Bölüm 19'da ele alındığı gibi, birçok kanser DNA hasarı oluşturarak ya da DNA replikasyonunu baskılayarak hızlı bir şekilde bölünen hücreleri öldüren ilaçlar ile kemoterapi yoluyla tedavi edilir. Bu ilaçlar, sadece kanser hücrelerine karşı seçici-etkili değildir, aynı zamanda kan, deri, saç ve bağırsak epiteli gibi kök hücreler tarafından sürekli yenilenen normal dokular için de toksiktir. Hematopoetik kök hücreleri vücudun en hızlı bölünen hücreleri arasında yer alır, bu nedenle kansere karşı kullanılan ilaçların bu hücreler üzerindeki toksik etkileri kanser tedavisinde kemoterapinin etkinliğini çoğunlukla sınırlamaktadır. Kök hücre nakli bu toksisiteyi atlamak için bir çözüm sağlar, bu yol kanser hastalarının tedavisinde daha yüksek ilaç dozlarının daha etkili bir şekilde kullanımına izin verir. Bu işlemde, hasta normal koşullarda hematopoetik sistem üzerindeki toksik etkilerinden dolayı normalde kaldıramayacağı kadar yüksek dozlarda kemoterapi ile tedavi edilir (Şekil 18.23). Ölümcül hasar, yeni hematopoetik kök hücrelerin (kemik iliğinden ya da periferal kandan elde edilen) nakli ile tamir edilir, böylece normal hematopoetik sistem yenilenir. Bazı durumlarda, kök hücreler hastadan kemoterapiden önce elde edilir, depolanır, ve kemoterapi tamamlandıktan sonra hastaya geri verilir. Ancak, bu hücrelerin kanser hücreleri ile bulaşmadığından emin olmak önemlidir. Alternatif

Bilgi İçin

Akraba olmayan bir vericiden alınarak saklanan göbek kordonu da transplantasyonda hematopoetik kök hücre kaynağı olarak kullanılabilir.



Şekil 18.23 Hematopoetik kök hücre nakli Bir kanser hastası, tümör hücrelerini etkin bir şekilde öldüren yüksek doz kemoterapi ile tedavi edilir, ancak normalde hematopoetik sistem üzerindeki potansiyel ölümcül hasar nedeniyle bu tedavi tolere edilemez. Bu hasar yeni hematopoetik kök hücre transplantasyonu ile tamir edilir.

olarak nakledilen kök hücreler, hastanın doku tipi ile eşleşen sağlıklı bir vericiden (genellikle yakın akrabasından) elde edilebilir. Kanser tedavisindeki kullanımlarına ek olarak hematopoetik kök hücre nakilleri aplastik anemi, hemoglobin bozuklukları ve bağışıklık (immün) yetersizlikleri gibi hematopoetik sistem hastalıklarına sahip hastaların tedavisinde de kullanılır.

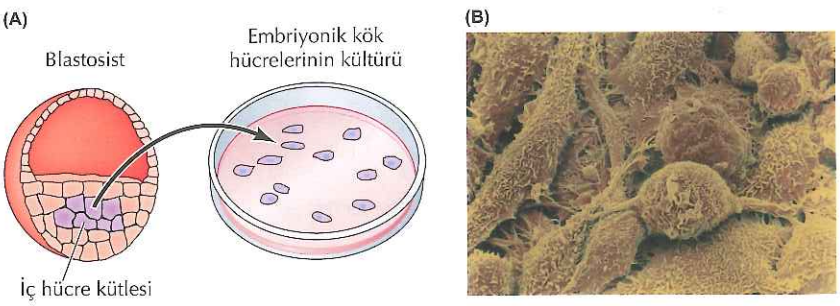
Epitel kök hücreleri de yanıklara, yaralara ve ülserlere sahip hastaların tedavisinde kullanılan deri yamaları oluşturulmasında klinik uygulama alanı bulmuştur. Bu uygulamaların bir yolu, epidermal deri hücrelerinin bir epitel tabakası oluşturmak için kültürde çoğaltılması daha sonra hastaya aktarılmasıdır. Hastanın kendi derisi bu işlem için kullanılabilir, bu bağışıklık sistemi tarafından yama reddi komplikasyonunu ortadan kaldırır. Diyabet, Parkinson ve müsküler distrofi gibi diğer hastalıkların da benzer iyileştirme tedavileri için erişkin kök hücrelerinin kullanım olanakları araştırılmaktadır. Bununla birlikte, erişkin kök hücrelerin uygun bir kök hücre popülasyonundan saf olarak elde edilmesi ve kültüre alınıp çoğaltılmasındaki zorluklar nedeniyle klinikteki uygulamaları sınırlıdır.

Pluripotent Kök hücreler, Hücresel Yeniden Programlama ve Rejeneratif Tıp

Erişkin kök hücreleri izole etmek ve kültürde üretilmeleri zor olsa da, erken embriyoların kök hücrelerini **(embriyonik kök hücreleri)** izole etmek ve çoğalmak nispeten basittir. Bu hücreler erişkin organizmaların farklılaşmış tüm hücre tiplerine dönüşme yeteneklerini koruyarak sonsuza kadar saf kök hücre grupları olarak büyüyebilirler **(pluripotensi).** Sonuç olarak, sadece temel bilim açısından değil ayrıca transplantasyon tedavisinde hücre kaynağı olarak potansiyel kullanımları nedeniyle embriyo kök hücrelerine çok büyük bir ilgi vardır. Embriyonik kök hücreleri üzerinde devam eden çalışmalar, embriyonik kök hücrelerinin pluripotensi özellik taşıması ya da farklılaşmış hücrenin farklı bir tipi gibi davranmaları nedeniyle, erişkin hücrelerin yeniden programlanabileceğini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmalar hücre kaderinin kontrolüne ilişkin yeni bakış açılarına ışık tutmaktadır, ve rejeneratif tıpta önemli uygulama alanları bulması olasıdır.

Embriyonik kök hücreleri

Embriyonik kök hücreleri ilk kez 1981 yılında fare embriyolarından kültüre edilmiştir (Şekil 18.24). Bunlar kültürde süresiz olarak ürerler ve erken embriyolar içine yeniden konulmaları durumunda, farenin bütün dokularındaki hüc-



Şekil 18.24 Memeli embriyonik kök hücre kültürü (A) Embriyonik kök hücreleri, erken embriyo (blastosist) iç hücre kütlesinden kültürlenir. (B) Kültürdeki embriyonik kök hücrelerinin taramalı elektron mikrofotoğrafı.

Anahtar Deney

Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü

Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells

Gail R. Martin
University of California at San Francisco
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1981, Volume 78, pages 7634-7638

Bağlam

Erken dönemdeki embriyoların hücreleri erişkin hayvanların dokularını ve organlarını oluşturan hücrelerin tüm tiplerine farklılaşmaya ve çoğalmaya yetenekleri açısından benzersizdir. 1970 yılında, fare erken dönem embriyoları uterustan çıkarılıp alakasız bir yere nakledildiklerinde sıklıkla tümör geliştiği gösterildi. Teratokarsinom olarak isimlendirilen bu tümörler, hayvanın içinde büyüdükçe bir dizi farklı dokuyu oluşturma yeteneğine sahip hücreler içerdikleri gözlendi. Buna ek olarak, teratokarsinom hücreleri (embriyonal karsinom hücreleri olarak da adlandırılır) izole edilip doku kültüründe yetiştirilebiliyorlardı. Normal embriyo hücrelerine benzeyen bu hücreler kültürde çeşitli hücre türlerine farklılaşmaları için uyarılabiliyorlardı. Bazı embriyo karsinom hücreleri, erken fare embriyolarına (blastosistlere) enjekte edilirse, daha sonra da bir taşıyıcı anneye uygulanırsa bir farenin normal gelişimine katkıda bulunabiliyordu.

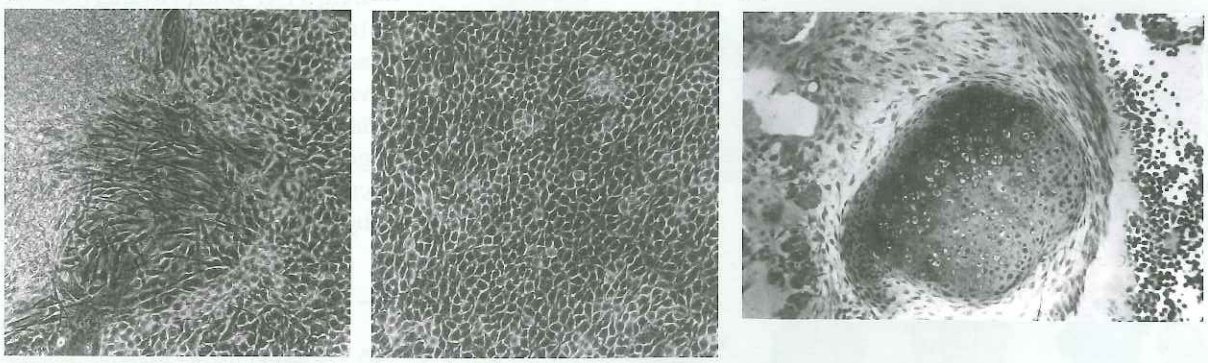
Embriyonal karsinom hücrelerinin çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme ve normal fare gelişimine katılabilme yeteneği, bu tümörlerden kaynaklanan hücrelerin normal embriyonik kök hücreler ile yakın ilişkili hücreler olabileceğini düşündürdü. Ancak, farelerde teratokarsinomların oluşması sırasında meydana gelen olaylar bilinmiyordu. Gail Martin, teratokarsinomlarda bulunan embriyonal karsinom hücrelerinin aslında, uterustan çıkarılıp alakasız bölgelere aktarıldıklarında normal farklılaşmayı başlatacak uygun sinyalleri alamadıkları için anormal çoğalan, normal embriyo hücreleri oldukları hipotezini savundu. Bu hipoteze dayanarak, normal embriyonik kök hücre hatlarını elde etmek amacı ile fare embriyolarından hücre kültürleri yapmaya çalıştı. Onun yaptığı deneyler, ayrıca Martin Evans ve Matthew Kaufman' ın benzer çalışmaları (Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, 1981, 292: 154-156), pluripotent kök hücrelerin, normal fare embriyolarından doğrudan kültürlenebileceğini gösterdi. Bu embriyonik kök hücre hatlarının izolasyonu, fare gelişim analizlerinin ve genetik düzenlemelerin yanı sıra insan embriyonik kök hücrelerinin transplantasyon tedavilerinde kullanılma olasılığının da yolunu açmıştır.

Gail R. Martin

Deneyler

Embriyonal karsinom hücrelerinin normal embriyonik kök hücrelerden kaynaklandığı temeline dayanarak, Martin normal fare blastosistlerinden elde edilen hücreleri kültürde çoğaltmaya çalıştı. Yaklaşık 30 embriyodan sağlanan hücreler ile başlayarak, kültürde büyüttüğü hücrelerden bir hafta sonra dört koloni izole etti. Bu hücreler, tekrarlanan kültür pasajlarıyla bol miktarda elde edilebildi, ve deney fare embriyoları ile tekrarlandığında, benzer yeni hücre dizileri oluşturuldu.

Normal embriyodan (embriyonik kök hücreleri) oluşan hücre hatları, tümör kökenli embriyonom karsinom hücrelerine çok benziyordu. Daha da önemlisi, embriyonik kök hücreler, kültürde endodermal hücreler, kıkırdak ve nöron-benzeri hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşabiliyorlardı (bkz. Şekil).



Embriyonik kök hücreleri, kültürde nöron-benzeri hücreler (A), endodermal hücreleri (B) ve kıkırdak hücreleri (C) de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşırlar.

(Sonraki sayfada devam edecek)

Anahtar Deney

Ayrıca, embriyonik kök hücreler fareye enjekte edildiğinde, çeşitli farklılaşmış hücre tiplerini içeren tümörler gelişiyordu. Böylece, çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneğini koruyan embriyonik kök hücre hatlarının, kültürde normal fare embriyosundan oluşturulabileceği anlaşıldı.

Etki

Embriyo kök hücre hatlarının oluşturulması, fare genetiği ve gelişimi çalışmalarına büyük etkisinin yanı sıra, çeşitli insan hastalıklarının tedavisi için yeni olanakların açılmasını da etkisi olmuştur. Sonraki çalışmalar, embriyonik kök hücrelerin, fare embriyosuna enjeksiyonunu takiben, normal fare gelişimine katıldığını göstermiştir. Gen aktarımı teknikleri kültürüne embriyonik kök hücrelerdeki genleri değiştirmek veya nakletmek amacıyla kullanılabildiklerinden, bu hücreler fare gelişimindeki çeşitli genlerin rollerini anlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bölüm 4'de tartışıldığı gibi, embriyonik kök hücrelerde ilgilenen herhangi bir ilgilenilen gen, klonlanmış bir DNA ile homolog rekombinasyon yoluyla susturulabilir ve bu genin fare gelişimindeki rolü, değiştirilmiş embriyonik kök hücreler fare embriyosuna naklederek, belirlenebilir.

İki grup araştırmacı, ilk kez 1998 yılında, ilk, insan embriyonik kök hücre hatlarını geliştirdiler. Bu hücrelerin çoğalma ve farklılaşma yeteneklerinden dolayı, çeşitli hastalıkların tedavisi için yeni tedavi yöntemlerinin gelişebileceği umudunu verdiler. Birçok teknik problemin olmasına rağmen pluripotent kök hücrelerin kullanımını temel alan transplantasyon tedavileri, Parkinson, Alzheimer, diyabet ve omurilik yaralanmaları gibi hastalıkların kesin tedavisi için en iyi umuttur.

relere dönüşebilirler. Bu nedenle pluripotent özellik taşırlar ve erişkin doku ve organlarda tüm farklı hücre türlerini geliştirme yeteneğine sahiptirler. Buna ek olarak, kültürde birçok farklı hücre tiplerine farklılaştırılmak üzere uyarılabilirler.

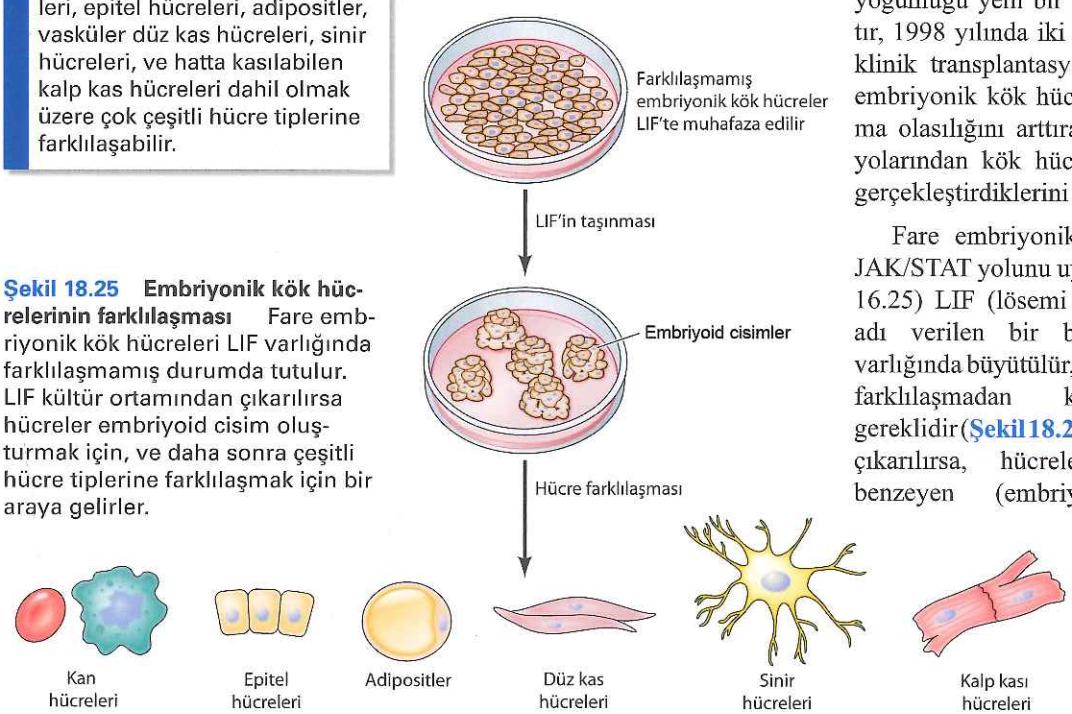
Bölüm 4'de anlatıldığı gibi fare embriyonik kök hücreleri, farelere değiştirilmiş genlerin aktarılmasında kullanılabildiğinden hücre biyolojisinde önemli bir deney aracı olmuştur (bkz. Şekil 4.35). Ayrıca, embriyonik hücrelerinin farklılaşması ile ilişkili moleküler ve hücresel olayların incelenmesi için mükemmel bir model sistemi oluşturular, bu nedenle embriyo kök hücreleri hücre ve gelişim biyologlarının ilgisini çekmektedir. Bu hücreler üstündeki ilginin yoğunluğu yeni bir zirveye ulaşmıştır, 1998 yılında iki araştırmacı grup klinik transplantasyon tedavilerinde embriyonik kök hücrelerinin kullanma olasılığını arttıran, insan embriyolarından kök hücre izolasyonunu gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir.

Fare embriyonik kök hücreleri, JAK/STAT yolunu uyaran (bkz. Şekil 16.25) LIF (lösemi önleyici faktör) adı verilen bir büyüme faktörü varlığında büyütülür, LIF bu hücreleri farklılaşmadan korumak için gereklidir (**Şekil 18.25**). LIF ortamdan çıkarılırsa, hücreler embriyolara benzeyen (embriyoid cisimler)

Video 18.3

sites.sinauer.com/cooper7e/v18.3

Farklılaşmış Kasılabilen Kalp Hücreleri Hücreler kan hücreleri, epitel hücreleri, adipositler, vasküler düz kas hücreleri, sinir hücreleri, ve hatta kasılabilen kalp kas hücreleri dahil olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilir.



Şekil 18.25 Embriyonik kök hücrelerinin farklılaşması Fare embriyonik kök hücreleri LIF varlığında farklılaşmamış durumda tutulur. LIF kültür ortamından çıkarılırsa hücreler embriyoid cisim oluşturmak için, ve daha sonra çeşitli hücre tiplerine farklılaşmak için bir araya gelirler.

yapılar şeklinde kümeleşirler ve daha sonra kan hücreleri, epitel hücreleri, adipositler, vasküler düz kas hücreleri, sinir hücreleri ve hatta kasılabilen kalp kası hücreleri de dahil olmak üzere geniş bir yelpazedeki hücre tiplerine farklılaşabilirler. İnsan embriyonik kök hücreleri LIF'e gerek duymaz, ancak başka büyüme faktörleri ile farklılaşmadan aynı şekilde kalabilirler.

Önemli bir nokta, embriyonik kök hücreleri kültür ortamına uygun büyüme faktörleri veya küçük moleküller (örn., retinoik asit) eklenmesiyle özel yolaklar üzerinden farklılaşmaya yönlendirilebilir. Bu yol ile organ nakli tedavisi için, örneğin, kalp hücreleri ve sinir hücreleri gibi, özel tipteki hücre popülasyonlarını elde etmek mümkündür. Örneğin, hem fare hem de insan embriyo kök hücrelerinin kardiyomiyositlere, çeşitli tipteki sinir hücrelerine ve pankreasın insülin üreten β hücresine farklılaşması için yöntemler geliştirilmiştir, Bu farklılaşmış hücreler fare modellerinde kardiyak aritmi, Parkinson hastalığı, omurilik yaralanması, maküler dejenerasyona bağlı körlük ve diyabetin fare modellerinde tedavi için kullanılmaktadır. Devam eden araştırmalar, özel yollar aracılığı ile farklılaşmış hücre toplulukları üreten embriyonik kök hücrelerin farklılaşma etkinliklerini arttırmaya ve böylece çeşitli hastalıkların transplantasyon tedavisinde kullanılabilen farklılaşmış hücre toplulukları oluşturmak için protokoller geliştirmeye odaklanmıştır.

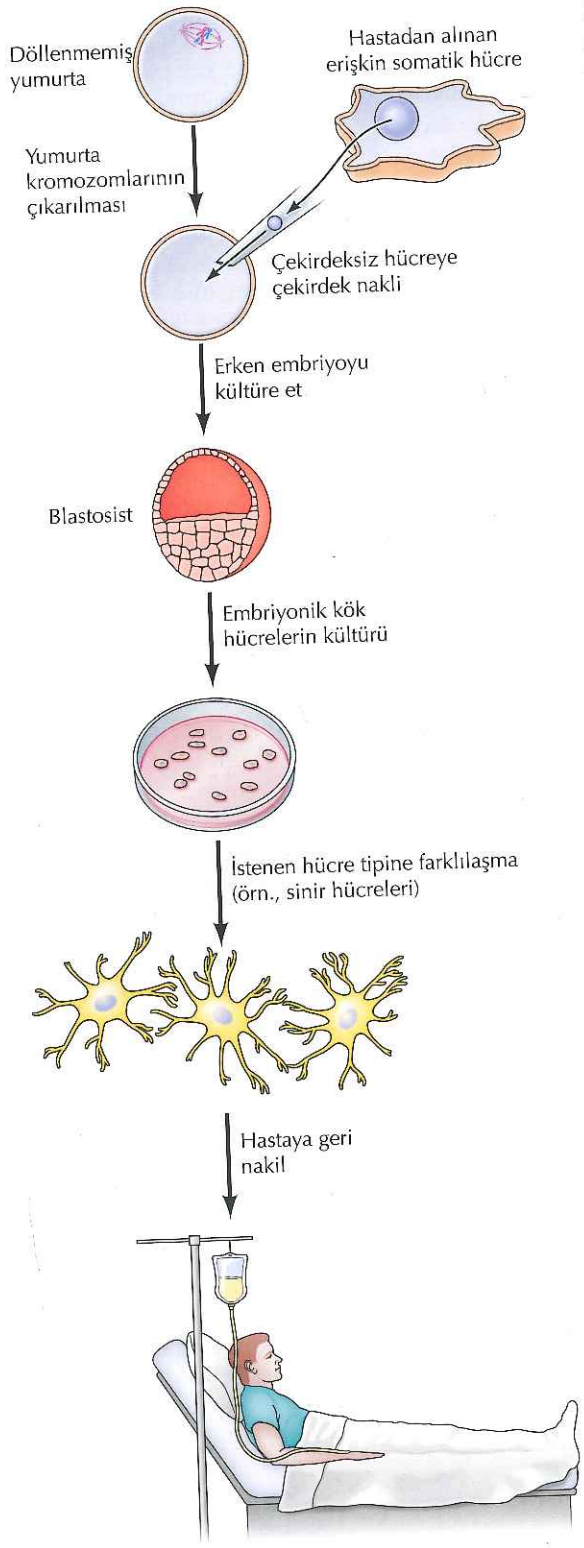
Video 18.4
sites.sinauer.com/cooper7e/v18.4
Işık ile Kök Hücrelerin Kontrolü Hem fare hem de insan embriyonik kök hücrelerinin çeşitli tipteki nöronlara doğrudan farklılaştırmak için yöntemler geliştirilmiştir.

Video 18.5
sites.sinauer.com/cooper7e/v18.5
Somatik Hücre Çekirdek Nakli Somatik hücre nükleus aktarımı verici çekirdeğindeki aynı genetik alt yapıya sahip klonlarının üretilmesi için kullanılır.

Somatik hücre çekirdek nakli

1998 yılında insan embriyonik kök hücrelerin izolasyonunu, bir erişkin memeli hücresine ait çekirdeğin yaşayan bir hayvanın klonlanmasına neden olabileceğinin ilk kez gösterilmesi izledi. 1997 yılında Ian Wilmut ve arkadaşları koyun Dolly'i (**Şekil 18.26**) klonlanması ile rejeneratif tıpta yeni bir dönem başlatmıştır. Dolly, **somatik hücre nükleus nakli** olarak adlandırılan bir işlemle, bir meme epitel hücresine ait nükleusun normal bir yumurtanın yerini alacak nükleusu çıkarılmış döllenmemiş bir yumurtanın içine nakli ile oluşturuldu. İlginç olan, bu tür deney ilk kez 1962 yılında John Gurdon tarafından kurbağalara uygulanmıştı. Aslında, memelilerdeki bu başarılı uygulamanın 40 yıl gibi bir süre alması işlemin teknik zorluğunu kanıtlamaktadır. Wilmut ve arkadaşlarının ilk başarılarından bu yana, nükleusu çıkarılmış yumurta içine erişkin somatik hücrelerinden elde edilen çekirdeklerin nakli, koyun, fare, domuz, sığır, keçi,

Şekil 18.26 Somatik hücre çekirdek nakli ile kolanlama (A) Bir erişkin somatik hücre nükleusu kromozomları çıkarılmış (çekirdeksiz), döllenmemiş normal bir yumurtaya aktarılır. Daha sonra erken embriyoya kadar kültüre edilir ve erişkin çekirdek vericisinin bir klonunu doğuracak olan taşıyıcı anneye aktarılır. (B) Dolly (Erişkin koyun, solda), ilk klonlanmış memeli oldu. Normal üreme işlemleri ile üretildiği kuzusu Bonnie ile görülmekte, (Fotoğrafçı Roddy Field; T. Wakayama ve R. Yanagimachi' nin izniyle).

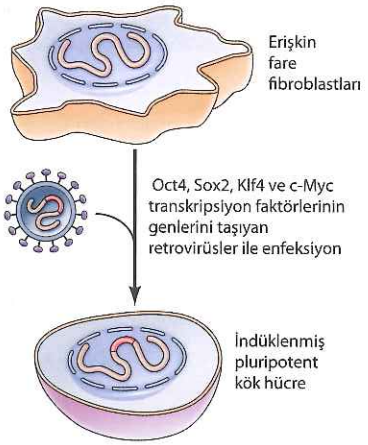


tavşan ve kedi dahil olmak üzere çeşitli memeli türlerinin klon yavrularını oluşturmak için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, memelilerde somatik hücre çekirdek nakli ile klonlamada, genellikle embriyoların yalnızca %1 veya 2'sinden canlı yavrular doğmaktadır, bu nedenle oldukça verimsiz bir uygulama olarak kabul edilir. Ayrıca, doğum sonrasında az sayıda hayatta kalan hayvanlar, genellikle sınırlı bir yaşam süresine neden olan birçok anormallik taşırlar. Örneğin Dolly sadece 6 yıl yaşadı (normal bir koyun ömrünün yaklaşık yarısı). Hem somatik hücre çekirdek transferindeki verimsizlikler hemde klonlanmış hayvanların yaygın anormalliklerinden dolayı DNA metilasyonundaki geri dönüşler dahil olmak üzere, bir erişkin çekirdeğinin epigenetik durumunun yeniden programlamada zorluklar ortaya çıkardığı düşünülmektedir.

Somatik hücre çekirdek nakli ile hayvan klonlama, embriyonik kök hücrelerin özellikleri ile birlikte, terapötik klonlama olasılığının önünü açmıştır. (Şekil 18.27). Terapötik klonlanmada erişkin bir insan hücresinden alınan çekirdek, kültürde erken embriyo üretilmesi için kullanılacak çekirdeği çıkarılmış bir yumurta hücresine aktarılır. Daha sonra embriyonik kök hücreleri, klonlanan embriyodan kültüre alınır ve transplantasyon terapisine uygun farklılaşmış hücre türleri oluşturmak için kullanılabilir. Bu düşünceyi destekleyen, somatik hücre çekirdek nakli ile insan embriyonik kök hücreleri ilk kez 2013'de üretmiştir. Terapötik klonlamada sağlanan önemli avantaj, bu yoldan elde edilen embriyonik kök hücrelerin, erişkin somatik hücre çekirdek vericisi olan alıcının genetiği ile özdeş olmasıdır. Bu da nakledilen dokuyu reddeden immün sistem engelini atlatır.

Terapötik klonlama olasılığı, kök hücre nakli tedavisinin uygulanabileceği çok çeşitli yıkıcı hastalıkların tedavisi için genel bir yaklaşım sağlar. Hayvan modellerinde bazı başarılar elde edilmiş olsa da, terapötik klonlama insanlara uygulanmadan önce üstesinden gelinmesi gereken büyük engeller vardır. Somatik hücre nükleus transferi ile oluşturulan embriyolardaki düşük verimliliği aşmak için de önemli iyileştirmeler gereklidir. Ayrıca, somatik hücre nükleus transferi ile klonlama, sadece insan klonlama (**üreme klonlama**) olasılığı açısından değil embriyonik kök hücrelerin kaynağı olarak görev yapan embriyoların yok edilmesi açısından da etik kaygıları arttırır. Bu endişeler, somatik hücreleri embriyonik kök hücrelere benzeyen pluripotent bir duruma yeniden programlamadaki son gelişmeler ile hafifletilebilmiştir.

Şekil 18.27 Terapötik klonlama Terapötik klonlamada bir hastanın hücre çekirdeği, erken embriyo kültürü oluşturmak üzere, çekirdeği çıkarılmış bir yumurtaya aktarılır, embriyonik kök hücreler daha sonra istenilen hücre türüne farklılaştırılır, ve hastaya geri nakledilir. Nakledilen hücreler (erişkin çekirdeğinin vericisi olan) alıcıya genetik olarak özdeş olacaktır, bu yüzden bağışıklık red komplikasyonlarından kaçınılmış olur.



Şekil 18.28 Uyarılmış pluripotent kök hücreler Kültürdeki erişkin fare fibroblastları dört transkripsiyon faktörünün genlerini taşıyan retroviral vektörler (bkz. Şekil 4.30) ile enfekte edilerek pluripotent kök hücrelerine dönüştürülür.

Uyarılmış pluripotent kök hücreler

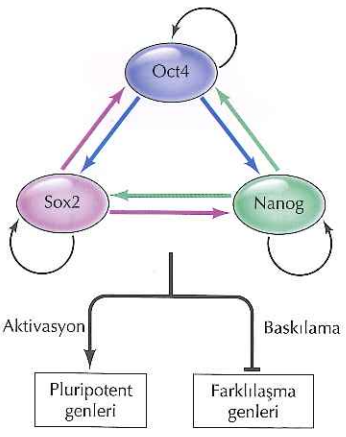
Somatik hücre çekirdek transferi ile embriyonik kök hücrelerin üretilmesindeki teknik ve etik zorluklara karşılık, erişkin somatik hücrelerin kültürde doğrudan pluripotent kök hücrelerine dönüştürülebildiğini gösteren çalışmalar ile bu alanda önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Bu işlem, embriyolardan üretim ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır ve somatik hücreleri embriyonik kök hücreler gibi davranan bir organizmanın bütün dokularını oluşturma potansiyeline sahip kök hücrelere dönüştürmek için doğrudan bir mekanizma sağlamaktadır.

Somatik hücrelerin pluripotent kök hücrelere dönüşümü (ya da yeniden programlama) ilk kez 2006 yılında Kazutoshi Takahashi ve Shinya Yamanaka tarafından bildirilmiştir. Onlar retroviral gen aktarımıyla sokulan sadece dört transkripsiyon faktörünün işlevleriyle, fare fibroblastlarının embriyonik kök hücrelere benzeyen hücrelere (uyarılmış pluripotent kök hücreler olarak isimlendirilen) yeniden programlanabildiğini buldular. (**Şekil 18.28**). Sonraki çalışmalarda, uyarılmış pluripotent kök hücrelerinin, erken fare embriyoları içine sokulduğunda embriyonik kök hücreler gibi tüm hücre tiplerine farklılaştığı gösterilmiştir. Daha da önemlisi, bir sonraki araştırmada erişkin insan fibroblastlarının benzer bir işlemle pluripotensi için yeniden programlanabileceği gösterilmiştir. Böylece, transplantasyon terapisinde kullanımında pluripotent kök hücrelerin türetilmesi için yeni bir yol açılmıştır, bir hastanın deri hücrelerinin kültürde doğrudan uyarılmış pluripotent kök hücrelerinden doğrudan dönüştürmek artık mümkündür.

Erişkin somatik hücrelerin pluripotent kök hücrelerine yeniden programlanmasında sadece dört temel transkripsiyon faktörünün yeterli olduğu kayda değer bir bulguydu ve hücre kaderini kontrol eden yeni transkripsiyonel programların araştırılması için büyük bir teşvik oldu. Uyarılmış pluripotent kök hücrelerin fibroblastlardan yeniden programlanması sadece Takahashi ve Yamanaka tarafından başlangıçta kullanılan dört transkripsiyon faktörü tarafından değil (bkz. Şekil 18.28), aynı zamanda çeşitli transkripsiyon faktörlerinin alternatif kombinasyonları tarafından da uyarılabilir. Pluripotensiyi uyaran bu transkripsiyon faktörlerinin tüm kombinasyonları, embriyo hücrelerinde de ifade edilen ve pluripotent durumunu koruyan bir transkripsiyon programını aktifleştirir. Üç merkezi transkripsiyon faktörü (Oct4, Sox2 ve Nanog) bu programda ana rol oynamaktadır (**Şekil 18.29**). Bu faktörler, pozitif olarak birbirlerinin gen ifadelerini düzenleyip birlikte hareket ederek bir otoregülatör döngü oluştururlar Buna ek olarak, özel hücre hatları boyunca farklılaşmaya olanak veren genleri baskılarken pluripotensiyi koruyan diğer genlerin ifadesini aktifleştirirler. Bu transkripsiyonal programın pozitif

Bilgi İçin

Fizyoloji veya Tıp 2012 Nobel ödülü sırasıyla, kurbağalarda somatik hücre nükleus transferi (1962) ve erişkin somatik hücrelerin yeniden programlanması ile uyarılmış pluripotent kök hücre (2006), keşifleri için Sir John Gurdon ve Shinya Yamanaka'ya ortaklaşa verildi.



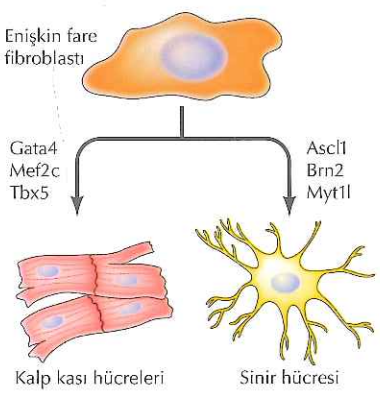
Şekil 18.29 Pluripotensi transkripsiyon program Üç temel transkripsiyon faktörü Oct4, Sox2 ve Nanog pluripotent durumunu korur. Bu faktörler pozitif otoregülatör döngü oluşturur, aynı zamanda pluripotensiyi koruyan genleri aktifleştirirler ve farklılaşmayı uyaran genleri bastırırlar.

otoregülasyonu, uygun sinyallere yanıt olarak hücrelerin farklılaşmasına izin verirken, pluripotensiyi korur. Buna ek olarak, özel hücre hatları boyunca farklılaşmaya olanak veren genleri baskılarken pluripotensiyi koruyan diğer genlerin ifadesini aktifleştirirler.

Pluripotensi devamlılığının otoregülasyonu, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin potansiyel terapötik kullanımı için araştırmacıların önündeki büyük bir engelin aşılmasına izin vermesi açısından dikkat çekicidir. Şöyle ki, başlangıçta fibroblastları yeniden programlamak için kullanılan transkripsiyon faktörlerinin (örn., c-Myc) bazıları onkogenler gibi rol alabilir, bu şekilde üretilen uyarılmış pluripotent kök hücrelerin transplantasyonundan sonra yüksek kanser riski ortaya çıkabilir (bkz. Şekil 18.28). Ayrıca, fibroblastlara genler sokulması için kullanılan retroviral vektörler kanser gelişimine yol açan zararlı mutasyonlara neden olabilirler. Yakın zamanlarda, yeniden programlama faktörlerinin geçici ifadesi ile pluripotent kök hücre oluşturmak için viral genom veya yabancı genlerin kararlı entegrasyonuna gerek kalmayan yöntemler geliştirilmiştir. Alıcı somatik hücre pluripotent duruma yeniden programlandığında, yeniden programlamayı uyaran faktörlerin sürekli ifadesine gerek kalmadan otoregülasyon ile pluripotensi korunur. Böylece yeniden programlama faktörlerinin geçici ifadesi ile üretilen uyarılmış pluripotent kök hücreleri, transplantasyon tedavisinde pluripotent kök hücrelerin hazır bir kaynağını oluştururlar.

Somatik hücrelerin başka tip hücrelere farklılaşması

Somatik hücrelerin uyarılmış pluripotent kök hücrelere yeniden programlanma başarısı, transdiferansiyasyon olarak adlandırılan, somatik hücrelerin alternatif olarak diğer farklılaşmış hücre tiplerine yeniden programlanabilme olasılığını arttırmıştır. Bu durum **transdiferansiyasyon** olarak adlandırıldı. Transdiferansiyasyon ilk kez 1987'de, transkripsiyon faktörü MyoD'nin fibroblastların kas hücrelerine dönüşmesinde etkili olduğunu gösteren Harold Weintraub ve arkadaşları tarafından kanıtlamıştır. Yakın zamanlarda bilim insanları üç ile dört transkripsiyon faktörünün birlikte kullanımıyla fibroblastların pluripotent kök hücrelerine yeniden programlanmasında ki başarısına dayanarak, farklı transkripsiyon faktörü kombinasyonları ile fibroblastların transplantasyon tedavisinde kullanılabilecek diğer hücre tiplerine farklılaştırılabilme olasılığını araştırdılar. Özellikle, fare fibroblastlarının hem kalp kası hücrelerine hem de sinir hücrelerine farklılaşması sadece üç transkripsiyon faktörünün uygun kombinasyonları ile başarılmıştır (**Şekil 18.30**). Farklılaşmış kan hücreleri ya diğer kan hücre tiplerine ya da hematopoetik kök hücrelerine yeniden programlanabilir, böylece potansiyel olarak hematopoetik kök hücre transplantasyonunda hastaya ait hücrelerin yeni bir kaynağını oluştururlar (bkz. Şekil 18.23). Transdiferansiyasyon, transplantasyon tedavisinde kullanılabilecek, istenen türde farklılaşmış hücre topluluklarının üretilmesine ve bir hastadan alınan erişkin bir hücrenin doğrudan farklılaşmış hücrelere dönüşümüne yol açar, böylece pluripotent kök hücrelerine ihtiyaç kalmaz.



Şekil 18.30 Transdiferansiyasyon Fibroblastlar üç transkripsiyon faktörünün kombinasyonu ile kalp, sinir ve kas hücreleri dahil olmak üzere diğer farklılaşmış hücre tiplerine dönüşür.

ÖZET

Programlı Hücre Ölümü

- ***Apoptoz olayları:*** Programlanmış hücre ölümü, hem erişkin dokuların devamlılığında hem de embriyonik gelişimde önemli bir rol oynar. Akut yaralanma ile hücrelerin kazara ölümünün aksine programlanmış hücre ölümü apoptoz aktif bir işlem tarafından gerçekleştirilmektedir. Apoptotik hücreler ve hücre parçaları daha sonra etkili bir şekilde fagositoz ile ortadan kaldırılır. Apoptozun düzenlenmesinde ve yürütülmesinde sorumlu genler genetik analizler ile ilk olarak *C. elegans*' da tanımlanmıştır. Bkz. **Animasyon 18.1** ve **Video 18.1**

programlı hücre ölümü, nekroz, apoptoz

- ***Kaspazlar: Apoptozun işlemcileri:*** Kaspazlar apoptozun gerçekleştirilmesinde rol alan bir proteaz ailesidir. Kaspazlar başlatıcı veya efektör kaspazlar olarak sınıflandırılır ve her ikisi de hücre ölümüne yol açan bir yolakta iş görür. Efektör kaspazlar apoptozun olaylarını ortaya çıkaracak 100'den fazla hücresel proteini keserler.

kaspaz

- ***Apoptozun esas düzenleyicileri: Bcl-2 ailesi:*** Bcl-2 ailesinin üyeleri kaspaz aktivasyonu ve apoptoz için merkezi düzenleyicilerdir. Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri apoptozu uyarırken (proapoptotik) diğerleri apoptozu baskılar (antiapoptotik). Programlı hücre ölümünü kontrol eden sinyalleri proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 aile üyeleri arasındaki dengeyi değiştirebilir ve birbirlerini düzenleyen kontrol mekanizması bozulur. Memeli hücrelerinde proapoptotik Bcl-2 ailesinin üyeleri mitokondride iş görürler, sitokrom *c*'nin salınmasına katılırlar ve kaspaz aktivasyonununa yol açarlar. Kaspazlar da apoptozu baskılayan proteinler IAP tarafından doğrudan düzenlenir. Bkz. **Animasyon 18.2**

Bcl-2, apoptozom, IAP

- ***Apotozu düzenleyen sinyal yolları:*** Apoptoz, Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyelerinin gen ifadesini veya aktivitesini kontrol eden çeşitli sinyal yolları tarafından düzenlenir. Bu yollar; DNA hasarı ile uyarılan tümör baskılayıcı p53'ün aktivasyonu, büyüme faktörü ile uyarılan PI-3-kinaz/Akt sinyal yolunun aktivasyonu ve programlı hücre ölümünü uyaran polipeptidler tarafından ölüm reseptörlerinin aktivasyonu olarak sayılabilir. Bkz.**Video 18.2**

p53, PI 3-kinaz, Akt, tümör nekroz faktör (TNF)

- ***Programlı hücre ölümünün alternatif yolları:*** Otofaji ve kontrollü nekroz, programlı hücre ölümünün uyarılmasında apoptoza alternatifler sağlarlar.

otofaji, nekroptoz

Kök Hücreler ve Erişkin Dokuların Korunması

- ***Farklılaşmış hücrelerin çoğalması:*** Erişkin hayvanlarda çoğu hücreler hücre döngüsünün G_0 aşamasında tutulur. Farklılaşmış hücrelerin bazı tipleri örneğin deri fibroblastları, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve karaciğer hücreleri, yaralanma veya hücre ölümü ile yok olan hücrelerin yerini almak üzere çoğalmalarına devam edebilirler.

- ***Kök hücreler:*** Farklılaşmış hücrelerin çoğu kendileri çoğaltamaz ama kök hücrelerin çoğalmasıyla yerine yenisi geçebilir. Kök hücreler biri kök hücre olarak kalan diğeri bölünen ve farklılaşan iki yavru hücreye bölünür. Kök hücreler, hematopoetik sistemin, deri, bağırsak, iskelet kası, beyin ve kalp gibi çeşitli erişkin dokularında tespit edilmişlerdir

kök hücre, niş

- ***Erişkin kök hücrelerin tıbbi uygulamaları:*** Kök hücrelerin hasarlı dokuyu tamiri etmedeki yeteneğinden dolayı, klinik tıpta potansiyel olarak kullanımı önerilmektedir. Erişkin kök hücreleri hematopoetik kök hücre nakli ile hematopoetik sistem hasarını onarmada kullanılmaktadır. Ancak, erişkin kök hücrelerin klinik uygulamaları, bu hücrelerin izoasyonu ve kültürleme zorlukları nedeniyle sınırlıdır.

hematopoetik kök hücre nakli, kemik iliği nakli

ANAHTAR SÖZCÜKLER

ÖZET

Pluripotent Kök Hücreler, Hücresel Yeniden Programlanma ve Rejeneratif Tıp

- ***Embriyonik kök hücreler:*** Embriyonik kök hücreler, erken embriyodan kültürlenir. Bunlar bir organizmadaki farklı hücre türlerine farklılaşma yeteneklerini koruyarak kültürde farklılaşmamış halde büyüyebilirler, bu yüzden birçok klinik uygulama için erişkin kök hücrelerine karşı önemli bir üstünlüğe sahiptirler. Bkz. **Video 18.3** ve **18.4**
- ***Somatik hücre çekirdek nakli:*** Memeliler erişkin bir somatik hücre çekirdeğinin, çekirdeksiz yumurtaya nakledilmiş olan somatik hücre, çekirdek nakli yoluyla klonlanmıştır. Bu, klonlanmış embriyodan üretilecek olan ve erişkin çekirdek vericisinin transplantasyon tedavisi için kullanılacak olan embriyo kök hücrelerin terapötik klonlama olasılığının yolunu açmıştır. Birçok engelin aşılması gerekmektedir, buna rağmen terapötik klonlama olasılığı çeşitli yıkıcı hastalıklara karşı yeni tedavilerin geliştirilmesi için bir umut ışığıdır. Bkz. **Video 18.5.**
- ***Uyarılmış pluripotent kök hücreleri:*** Transplantasyon tedavisi için embriyonik kök hücrelerin kullanımına bir alternatif olarak, erişkin somatik hücreler dört anahtar transkripsiyon faktörü ile kültürde pluripotent kök hücrelere dönüştürülebilir.
- ***Somatik hücrelerin başka tip hücrelere farklılaşması:*** Somatik hücreler aynı zamanda, transkripsiyon faktörlerinin uygun kombinasyonları ile kalp, kas ve sinir hücreleri dahil olmak üzere diğer farklılaşmış hücre türlerine doğrudan dönüştürülebilirler.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

embriyonik kök hücresi, pluripotensi

somatik hücre nükleus transferi, terapötik klonlama, üreme klonlama

uyarılmış pluripotent kök hücre

transdiferansiyasyon

Atıf

Hücre
Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Sorular

1. Neden çok hücreli organizmalarda apoptoz yoluyla hücre ölümü nekroz ile hücre ölümüne karşı daha avantajlıdır?
2. Kaspaz aktivitesini düzenleyen moleküler mekanizmalar hangileridir?
3. Diyelim ki elinizde nükleusa ait laminleri mutant olan insan fibroblastları var. Laminlerdeki mutasyon, kaspazların kesim bölgesindeki Asp yerine Glu gelecek şekilde oluşturulmuştur. Bu mutant laminler apoptozun ilerlemesini nasıl etkiler?
4. Bcl-2 ailesi proteinleri memeli hücrelerinde apoptozu nasıl düzenler?
5. Hücre döngüsünü ve hücre yaşamını etkileyebilecek bir DNA hasarına yanıt olarak p53'ün işlevi nasıl olur?
6. Akt fosforilasyon bölgesi mutasyona uğratılarak artık daha fazla fosforile olamayan bir mutant Bad oluşturulduğunda, bu mutantın gen ifadesi hücre yaşamını nasıl etkiler?
7. 14-3-3 proteinlerinin siRNA ile gen ifadesi susturulursa apoptoz nasıl etkilenir?
8. Ced-3'e karşı siRNA uygulanırsa *C. elegans* gelişimi nasıl etkilenir?
9. Birçok erişkin dokusu çoğalmayan terminal olarak farklılaşmış hücreler içerir. Ancak, bu dokular hasarı takiben yenilenebilir. Bu dokuların kendilerini yenileme yetenekleri nasıl sağlanır?
10. Kök hücrelerin en önemli özelliği nedir?

11. Terapötik uygulamalar için erişkin kök hücrelerine kıyasla embriyonik kök hücrelerin olası avantajları nelerdir?
12. Embriyonik kök hücrelerine kıyasla uyarılmış pluripotent kök hücrelerin olası avantajları nelerdir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

(Her ana bölüm için en önemli derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Programlı Hücre Ölümü

Czabotar, P. E., G. Lessene, A. Strasser and J. M. Adams. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 49-63. [R]

Danial, N. K. and S. J. Korsmeyer. 2004. Cell death: Critical control points. *Cell* 116: 205-219. [R]

Ellis, H. M. and H. R. Horvitz. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44: 817-829. [P]

Fuchs, Y. and H. Steller. 2011. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147. 742-758. [R]

Gyrd-Hansen, M. and P. Meier. 2010. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-κB, inflammation and cancer. *Nature Rev. Cancer* 10: 561-574. [R]

Hay, B. A. and M. Guo. 2006. Caspase-dependent cell death in *Drosophila*. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 623-650. [R]

Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776. [R]

Holcik, M. and N. Sonenberg. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 318-327. [R]

Jope, R. S. and G. V. W. Johnson. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29: 95-102. [R]

Lauber, K., S. G. Blumenthal, M. Waibel and S. Wesselborg. 2004. Clearance of apoptotic cells: Getting rid of the corpses. *Mol. Cell* 14: 277-287. [R]

Levine, B. and G. Kroemer. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132: 27-42. [R]

Moldoveanu, T., A. V. Follis, R. W. Kriwacki and D. R. Green. 2014. Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem. Sci.* 39: 101-111. [R]

Riedl, S. J. and G. S. Salvesen. 2007. The apoptosome: signaling platform of cell death. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 405-413. [R]

Samejima, K. and W. C. Earnshaw. 2005. Trashing the genome: The role of nucleases during apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 677-688. [R]

Suzuki, J., D. P. Denning, E. Imanishi, H. R. Horvitz and S. Nagata. 2013. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science* 341: 403-406. [P]

Taylor, R. C., S. P. Cullen and S. J. Martin. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 231-241. [R]

Vandanabeele, P., L. Galluzzi, T. V. Berghe and G. Kroemer. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 700-714. [R]

Vaux, D. L. and J. Silke. 2005. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 287-297. [R]

Vousden, K. H. and X. Lu. 2002. Live or let die: The cells response to p53. *Nature Rev. Cancer* 2: 594-604. [R]

Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science* 296: 1635-1636. [R]

Kök Hücre ve Erişkin Dokuların Korunması

Blanpain, C. and E. Fuchs. 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 207-217. [R]

Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med.* 9: 653-660. [R]

Clevers, H. 2013. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 154: 274-284. [R]

Clevers, H., K. M. Loh and R. Nusse. 2014. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 346: 1248012. [R]

Daley, G. Q. and D. T. Scadden. 2008. Prospects for stem cell-based therapy. *Cell* 132:544-548. [R]

Dhawan, J. and T. A. Rando. 2005. Stem cells in postnatal myogenesis: Molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* 15: 666-672. [R]

Fuchs, E. and V. Horsley. 2008. More than one way to skin ... *Genes Dev.* 22: 976-985. [R]

Jones, D. L. and A. J. Wagers. 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 11-21. [R]

Kuang, S. and M. A. Rudnicki. 2008. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol. Med.* 14: 82-91. [R]

McCulloch, E. A. and J. E. Till. 2005. Perspectives on the properties of stem cells. *Nature Med.* 11: 1026-1028. [R]

Morrison, S. J. and A. C. Spradling. 2008. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132: 598-611. [R]

Orkin, S. H. and L. I. Zon. 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132: 631-644. [R]

Shi, X. and D. J. Garry. 2006. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 20: 1692-1708. [R]

Simons, B. D. and H. Clevers. 2011. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell* 145: 851-862. [R]

Taub, R. 2004. Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 836-847. [P]

Van Berlo, J. H. and J. D. Molkentin. 2014. An emerging consensus on cardiac regeneration. *Nature Medicine* 20: 1386-1393. [R]

Wu, S. M., K. R. Chien and C. Mummery. 2008. Origins and fates of cardiovascular progenitor cells. *Cell* 132: 537-543. [R]

Zhao, C., W. Deng and F. H. Gage. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132: 645-660. [R]

Pluripotent Kök Hücreler, Hücresel Yeniden programlanma ve Rejeneratif Tıp

Cohen, D. E. and D. Melton. 2011. Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine. *Nature Rev. Genet.* 12: 243-252. [R]

Davis, R. L., H. Weintraub and A. B. Lassar. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51: 987-1000. [P]

Fox, I. J., G. Q. Daley, S. A. Goldman, J. Huard, T. J. Kamp and M. Trucco. 2014. Use of differentiated pluripotent stem Cells in replacement therapy for treating disease. *Science* 345: 1247391. [R]

Hanna, J. H., K. Saha and R. Jaenisch. 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143: 508-525. [R]

Ieda, M., J.-D. Fu, P. Delgado-Olguin, V. Vedantham, Y. Hayashi, B. G. Bruneau and D. Srivastava. 2010. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142: 375-386. [P]

Ladewig, J., P. Koch and O. Brüstle. 2013. Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 225-236. [R]

Pagliuca, F. W., J. R. Milman, M. Gürtier, M. Segel, A. Van Devort, J. H. Ryu, Q. P. Peterson, D. Greiner and D. A. Melton. 2014. Generation of functional human pancreatic β cells *in vitro*. *Cell* 159: 428-439. [P]

Park, I.-H., R. Zhao, J. A. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T. A. Ince, P. H. Lerou, M. W. Lensch and G. Q. Daley. 2007. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451: 141-147. [P]

Shamblott, M. J. J. Axelman, S. Wang, E. M. Bugg, J. W. Littlefield, P. J. Donovan, P. D. Blumenthal, G. R. Huggins and J. D. Gearhart. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13726-13731. [P]

Tabar, V. and L. Studer. 2014. Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress. *Nature Rev. Genet.* 15: 82-92. [R]

Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872. [P]

Takahashi, K. and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676. [P]

Thompson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M.A. Waknotz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147. [P]

Vierbuchen, T., A. Ostermeier, Z. P. Pang, Y. Kokubu, T. C. Sudhof and M. Wernig. 2010. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463: 1035-1042. [P]

Wilmut, I., N. Beaujean, P. A. de Sousa, A. Dinnyes, T. J. King, L. A. Paterson, D. N. Wells and L. E. Young. 2002. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419: 583-586. [R]

Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. Mcwhir, A. J. Kind and K. H. S. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813. [P]

Wu, S. M. and K. Hechedlinger. 2011. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nature Cell Biol.* 13: 497-505. [R]

Young, R. A. 2011. Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 144: 940-954. [R]

Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. I. Slukvin and J. A. Thomson. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920. [P]

BÖLÜM 19

Kanser

Kanserin Gelişimi ve Nedenleri 723

Tümör Virüsleri 733

Onkogenler 737

Tümör Baskılayıcı Genler 749

Kanser Tedavisinde Moleküler Yaklaşımlar 758

Ananahtar Deney
Proto-onkogenlerin Keşfi 740

Moleküler Tıp
İmatinib: *brc/abl* Onkogenini Hedef Alan Kanser Tedavisi 763

Kanser, hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulmasının sonucu olduğundan, kitabın kanser konusuyla sonlanması oldukça uygundur. Çok hücreli organizmalarda her hücrenin çoğalması, farklılaşması ve sağkalımı önceki bölümlerde belirtildiği gibi organizmanın genel gereksinimleri doğrultusunda düzenlenir. Kanser hücrelerinde bu olayları düzenleyen mekanizma ortadan kalkar, hücreler kontrolsuz biçimde bölünerek çoğalmaya başlar ve sonunda tümör vücudun diğer bölgelerine yayılarak normal doku ve organların işlevini etkiler.

Kanser hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarındaki kusurlardan kaynaklandığı için, özellikle moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır. Moleküler biyologlar ile hücre biyologları bu yüzden kanseri anlayabilmek için yıllarca uğraş vermişler, daha da önemlisi, kanser araştırmaları sayesinde aynı zamanda hücrelerin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaları da aydınlatmışlardır. Hücrede; sinyal iletimi, hücre döngüsünün ve programlı hücre ölümünün düzenlenmesi gibi işlemlerde anahtar görev üstlenen proteinlerin birçoğu, ilk kez, hücrenin kontrolsuz çoğalmasına yol açan anormal aktiviteleri nedeniyle tanımlanabilmiştir. Kanser araştırmaları bu yönüyle hücrelerin çalışmasını düzenleyen mekanizmaların anlaşılmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuş, bu mekanizmalar da kanseri anlamamıza yardımcı olmuştur.

Kanserin Gelişimi ve Nedenleri

Kanserin gelişmesine neden olan temel değişiklik kanser hücrelerinin sürekli, kontrolsuz çoğalmasıdır. Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi göstermek yerine kontrolsuz biçimde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürerek, normal doku ve organları da istila eder ve sonunda tüm vücuda yayılırlar. Kanser hücrelerinin ortak özelliği olan çoğalmayı denetleyen mekanizmaların ortadan kalkması, çok hücreli sistemlerde biriken anomalilerin sonucudur. Kanser hücrelerini normal hücreden ayıran birçok davranış da bu özelliği yansıtır.

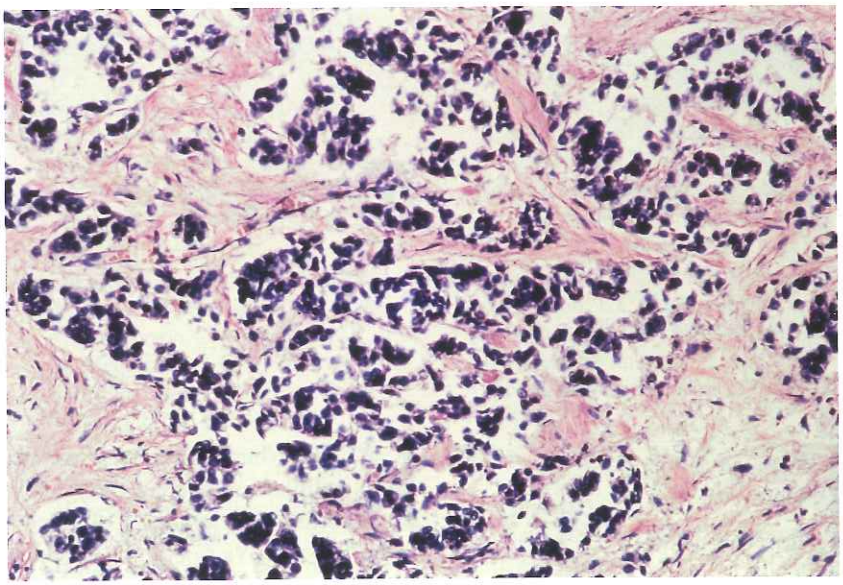
Video 19.1
sites.sinauer.com/cooper7e/v19.1
Normal Hücreler ile Kanser Hücrelerinin Karşılaştırılması
Kanser hücreleri normal hücre davranışlarını kontrol eden sinyallere uygun yanıtlar vermek yerine kontrolsüz bir şekilde büyür ve bölünürler.

Kanser türleri

Kanser vücutta yer alan herhangi bir hücrenin anormal çoğalması sonucu ortaya çıkabildiğinden, gerek davranış, gerekse tedaviye cevap yönünden önemli ölçüde değişiklik gösteren yüzden fazla değişik kanser türü mevcuttur. Kanser patolojisinde en önemli konu benign ve malin tümörleri birbirinden ayırabilmektir. Hücrelerin anormal çoğalması sonucunda ortaya çıkan **tümör** benign ya da malin olabilir. Deride görülen basit siğiller gibi **benign tümörler** çevredeki

Bilgi İçin

Kanserin en eski kayıtlı tanımı Mısırda MÖ 3000 dolaylarından kalan bir papirusta bulunmaktadır. Kanser teriminin ilk kez Hipokrat tarafından ortaya atıldığı ve tümörlerin şekli yengeç biçimini hatırlattığından bu tümörleri tanımlamak amacıyla eski Yunancada yengeç anlamına gelen "carcinos", "carcinoma" ve "cancer" terimlerini kullandığı düşünülmektedir.



Şekil 19.1 Bir pankreas kanseri Pankreastan alınan bir kesitte pankreas kanserini gösteren ışık mikroskobu görüntüsü. Kanser hücreleri koyu mor çekirdeklere sahiptir ve normal dokuyu (pembe) istila ediyor.

Animasyon 19.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a19.1

Kanserde Metastaz Kanser, değişikliğe uğrayan bir hücrenin çoğalan bir hücre topluluğu oluşturmasıyla başlar. Bu şekilde ortaya çıkan primer tümörden ayrılan hücreler vücudun başka bölgelerinde ikincil tümörler oluşturur.

normal dokuya ya da vücudun uzak bölgelerine yayılmadan oluştukları yerde kalırlar. Buna karşılık **malin tümörler** hem çevredeki normal dokuya (Şekil 19.1), hem de kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayılır **(metastaz).** Aslında sadece malin tümörler kanser olarak tanımlanır. Kanseri tehlikeli yapan, bunların yayılma ve metastaz yapma özellikleridir. Benign tümörler genellikle ameliyat ile çıkartılabildiği halde, malin tümörlerin vücudun uzak bölgelerine yayılması hastalığın sınırlı tedavi ile ortadan kaldırılmasını güçleştirir.

Gerek malin, gerekse benign tümörler türedikleri hücreye göre sınıflandırılır. Kanserlerin çoğu üç ana grupta toplanabilir: karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalar. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan **karsinomlar** epitel hücrelerinden kaynaklanan tümörlerdir. İnsanda az görülen **sarkomlar,** kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokusundan gelişen solid tümörlerdir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %8'ini oluşturan **lösemi** ve **lenfomalar** ise sırasıyla kan ya da immün sistem hücrelerinden gelişir. Tümörler ayrıca geliştikleri organa (örn., akciğer veya meme kanseri gibi) ve ilgili hücrenin türüne göre de sınıflandırılır. Örneğin, fibrosarkomlar fibroblastlardan, eritrolösemi ise eritrositlerin (alyuvarlar) öncü hücrelerinden kaynaklanır.

Bilgi İçin

Kanser insanlık tarihi boyunca mevcut olduğu halde ancak son yüzyıl içinde önde gelen ölüm nedenlerinden birine dönüşmüştür. 1900 yılından önce ölümlerin büyük bölümü zatürre ve tüberküloz gibi enfeksiyon hastalıklarından kaynaklanırdı ve yaşam beklentisi 50 yıldan daha azdı. Kanser ölümlerin küçük bir bölümünden sorumlu olan ender bir hastalıktı.

Çok sayıda kanser türü olduğu halde bunların pek azı sık görülür. (Tablo 19.1). Birleşik Devletler'de her yıl 1,5 milyondan fazla yeni kanser vakası görülmekte ve 600,000'den fazla kişi kanser nedeniyle ölmektedir. Toplam kanser olgularının %80'ini vücudun 12 bölgesinde ortaya çıkan kanserler oluşturur. Kanserlerin yarısından fazlasını oluşturan dört kanser türü prostat, meme, akciğer ve kolon/rektum kanserleridir. Şu ana kadar bilinen en ölümcül kanser olan akciğer kanseri, kansere bağlı ölümlerin %25'inden sorumludur.

Tablo 19.1 Amerikada En Sık Görülen Kanserler

Kanser bölgesi	Yılda olgu sayısı		Yılda ölüm sayısı	
Meme	234,200	(%14.1)	40,700	(%6.9)
Akciğer	221,200	(%13.3)	158,000	(%26.8)
Prostat	220,800	(%13.3)	27,500	(%4.7)
Kolon/rektum	102,500	(%6.2)	49,700	(%8.4)
Lenfoma	80,900	(%4.9)	20,900	(%3.5)
Mesane	74,000	(%4.5)	16,000	(%2.7)
Deri (melanom)	73,900	(%4.5)	9,900	(%1.7)
Uterus	67,700	(%4.1)	14,300	(%2.4)
Tiroid	62,500	(%3.8)	1,900	(%0.3)
Böbrek	61,600	(%3.7)	14,100	(%2.4)
Lösemiler	54,300	(%3.3)	24,500	(%4.2)
Pankreas	49,000	(%2.9)	40,600	(%6.9)
Yukarıdakilerin Toplamı	1,303,000	(%78.6)	418,100	(%70.9)
Bütün Bölgeler	1,658,000	(%100)	589,400	(%100)

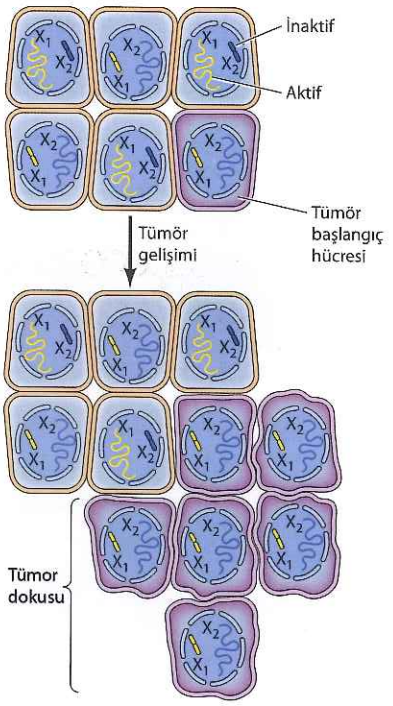
Kaynak: American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures 2015.*

Video 19.2
sites.sinauer.com/cooper7e/v19.2
Meme Kanseri Hücrelerinin Bölünmesi Tümör hücreleri birbiri ardına göç ederler ve büyüyerek düzensiz, çok tabakalı bir yapı oluştururlar.

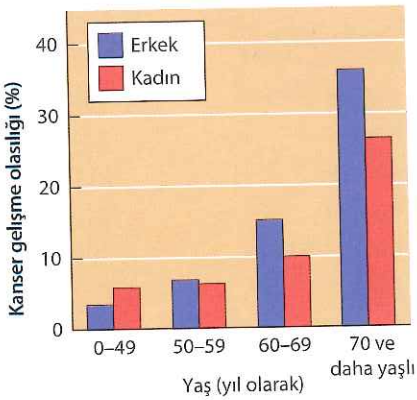
Kanserin gelişimi

Kanserin temel özelliklerinden biri klonalitedir. Tümörler anormal çoğalmaya başlayan bir tek hücreden gelişir. Birçok tümörün tek hücreden köken aldığı ilk olarak X kromozomu inaktivasyonu analizi ile gösterilmiştir **(Şekil 19.2)**. Bölüm 6'da anlatıldığı gibi dişi hücrelerinde X kromozomlarından biri heterokromatine dönüşerek inaktive olur. X inaktivasyonu, embriyo gelişimi sırasında rastlantısal olarak gerçekleştiğinden, bazı hücrelerde bir kromozom inaktive olurken, bazı hücrelerde de diğer X kromozomu inaktifleşir. Bu yüzden X kromozomundaki genlerden biri için heterozigot olan dişilerde farklı hücrelerde farklı alleller eksprese olur. Normal doku farklı inaktif X kromozomları taşıyan hücrelerin karışımından oluştuğu için, heterozigot dişilerin normal dokusunda iki allelin de ekspresyonu görülür. Buna karşılık tümör dokusunda heterozigot X kromozomu genlerinden sadece bir tanesinin eksprese olduğu gözlenir. Bu, X inaktivasyonunun tümör gelişmeden önce tamamlandığını ve söz konusu tümörü oluşturan hücrelerin hepsinin aynı hücreden türediğini gösterir.

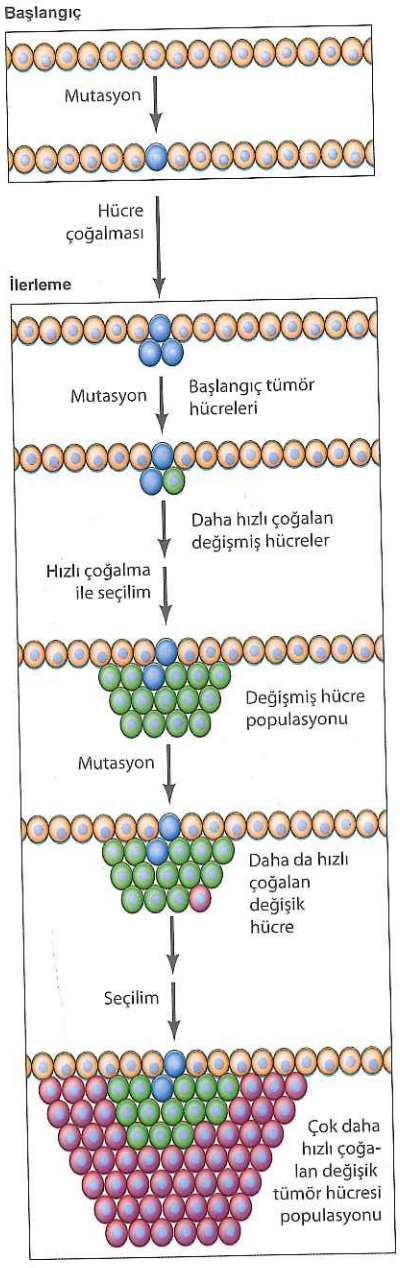
Tümörlerin klonal kökeni, tümör gelişmesine neden olan ilk öncül hücrenin, başlangıçta, kanser hücresinin bütün özelliklerine sahip olduğu anlamına gelmez. Tam tersine, kanserin gelişmesi hücrenin birbirini izleyen değişiklikler sonucu giderek malin şekle dönüştüğü, çok aşamalı bir süreçtir. Kanserin çok aşamalı bir olay olduğunu gösteren özelliklerden biri, birçok kanser türünün ileri yaşlarda ortaya çıkmasıdır **(Şekil 19.3)**. Kanser görülme sıklığının yaş ile büyük ölçüde artması, birçok kanser türünün uzun yıllar boyunca biriken çok sayıda anomalinin sonucunda gelişmesi yüzündendir.



Şekil 19.2 Tümörde klonalite Normal doku, farklı X kromozomlarının (X_1 ve X_2) inaktif olduğu hücrelerden oluşan karışık bir topluluktur. Tümörler değişime uğrayan tek bir hücreden türediğinden tümör hücrelerinin hepsinde daima aynı X kromozomunun inaktif olduğu gözlenir (X_1 inaktif, X_2 aktif).



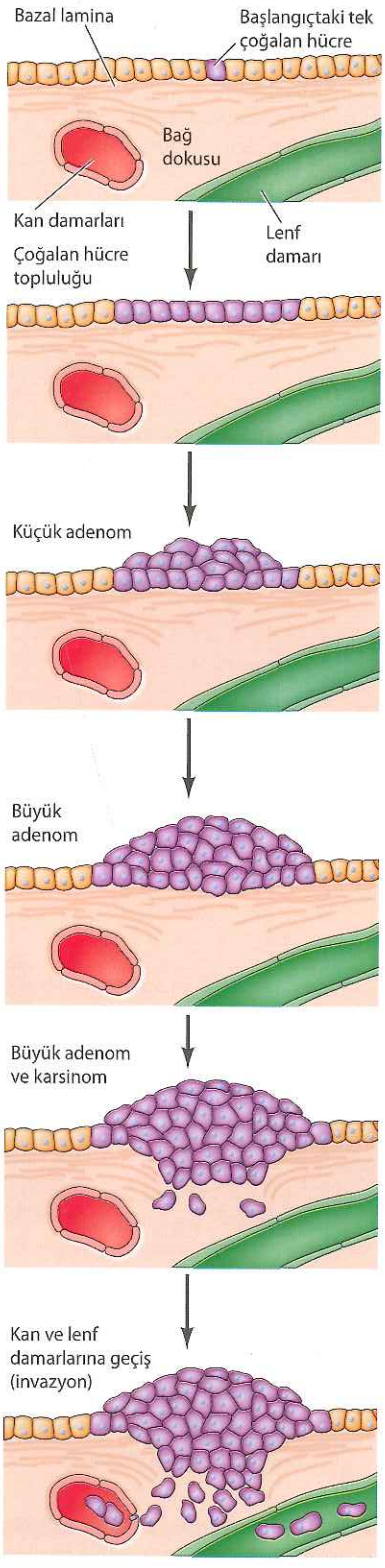
Şekil 19.3 Kanser sıklığında yaşa bağlı artış Kadın ve erkeklerde belirli yaş aralıklarında kanser görülme olasılığı. (American Cancer Society, *Cancer Facts and Figures 2015*)



Hücresel düzeyde kanserin gelişimi, mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreç sonucunda çoğalma, sağ kalım, invazyon ve metastaz yetenekleri giderek artan hücrelerin seçilmesi şeklinde ortaya çıkar (Şekil 19.4). Bu aşamaların ilki olan **tümör başlangıcı**, bir tek hücrenin anormal çoğalmasına neden olan genetik bir değişikliğin sonucudur. Hücre çoğalmasına paralel olarak klonal tümör hücrelerinden oluşan hücre topluluğu da giderek büyür. **Tümör ilerlemesi** bu topluluk içindeki hücrelerde yeni mutasyonların gerçekleşmesiyle devam eder. Tümör hücreleri genellikle mutasyon sıklığının artması ve kromozom anomalileri ile sonuçlanan yüksek düzeyde genetik instabilite gösterirler Bu mutasyonların bir bölümü hücreye daha hızlı çoğalma gibi belirli avantajlar kazandırır, bu hücrelerden türeyen ve söz konusu avantaja sahip olan yeni hücreler tümör topluluğu içinde gittikçe daha baskın nitelikler kazanırlar. Böylece, gerek çoğalma hızı, gerekse (sağkalım, invazyon ve metastaz yeteneği gibi) daha başka özellikler açısından avantajlı yeni bir tümör hücre klonu ortaya çıktığından bu işleme **klonal seçilim** adı verilir. Klonal seçilim tümör gelişimi boyunca devam eder ve tümörler bu nedenle giderek daha hızlı çoğalarak daha malin özellikler kazanırlar.

Kolon kanserleri üzerinde yapılan araştırmalar sık görülen bu insan tümörünün gelişmesinde ilerlemenin açık bir örneğini ortaya koymuştur (Şekil 19.5). Tümör gelişiminin en erken aşamasında kolon epitel hücrelerinin çoğalma hızı artar. Daha sonra hızlı çoğalan bu hücrelerden birinde küçük ve benign bir neoplazi (**adenom** veya **polip** gibi) ortaya çıkar. Yeni klonal seçilim döngüleri sonucunda gittikçe daha büyük ve hücre çoğalma hızı daha yüksek yeni adenomlar gelişir. Daha sonra tümör hücrelerinin bazal zarı geçerek altındaki bağ dokusuna ulaşmasıyla, benign adenomlardan malin karsinomlar gelişir. Kanser hücreleri çoğalmayı sürdürür ve kolon duvarını oluşturan bağ dokusu içinde de ilerleyerek sonunda kolon duvarını da aşar ve karın boşluğundaki mesane veya ince barsak gibi diğer organlara yayılırlar. Aynı zamanda kan damarlarına ve lenf yollarına da giren kanser hücreleri, böylece, vücudun diğer bölgelerine de metastaz yapma olanağını elde ederler.

Şekil 19.4 Tümör gelişiminin basamakları Kanser gelişimi mutasyona uğrayan tek bir hücrenin anormal çoğalması ile başlar. Ek mutasyonları takiben popülasyondaki daha hızlı çoğalan hücrelerin seçilimi, giderek daha hızlı çoğalan malin tümörlerin gelişmesi ile sonuçlanır.



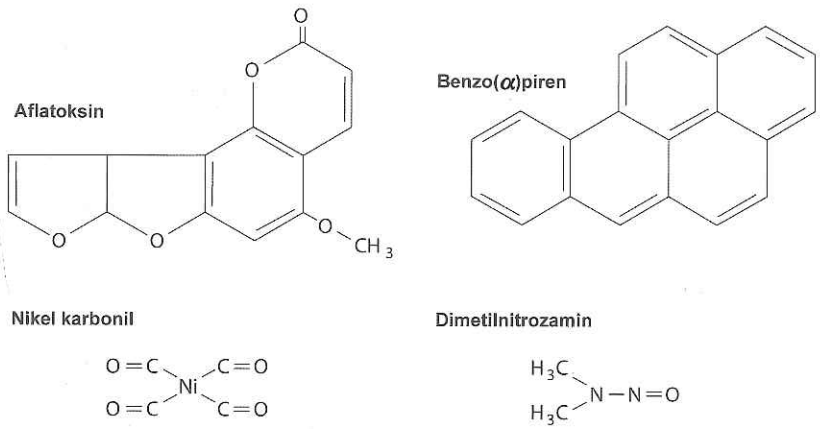
Şekil 19.5 Kolon karsinomu gelişimi Değişime uğrayan bir tek hücre çoğalan bir hücreler topluluğuna dönüşür. Bu hücreler önce gittikçe daha büyük benign adenomlara, daha sonra da malin karsinomlara dönüşür. Kanser hücreleri alttaki bağ dokusunu aşıp kana ve lenf yollarına girerek tüm vücuda yayılır.

Kanserin nedenleri

Kansere yol açan maddelere **karsinojen** denir, ve bunlar gerek deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalarla, gerekse insan topluluklarında kanserlerin rastlanma sıklığını irdeleyen (örn., sigara içenlerde akciğer kanserinin sık görülmesi gibi) epidemiyolojik çalışmalarla belirlenmiştir. Tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir işlem olduğundan birçok değişik faktör kanserin ortaya çıkma olasılığını etkileyebilir. Bu yüzden bir tek maddeyi kanserin nedeni olarak göstermekle olayı çok basite indirgemiş oluruz. Ancak gene de, radyasyon, kimyasallar ve virüslerin gerek deney hayvanlarında, gerekse insanlarda kansere neden olduğu gösterilmiştir.

Radyasyon ve birçok kimyasal karsinojen **(Şekil 19.6)** etkilerini DNA hasarı yaparak ve mutasyonları uyararak gösterirler. İnsanda kanser gelişmesine neden olabilen karsinojenler arasında, güneşin mor ötesi ışınları (deri kanserinin en önemli nedeni), tütün dumanındaki karsinojenik kimyasallar ve aflatoksin (uygun koşullarda saklanmayan fıstık ve tahılları kontamine eden mantarların oluşturduğu etkin bir karaciğer karsinojeni) sayılabilir. Sigara dumanındaki karsinojenler (benzo(α)piren, dimetilnitrozamin ve nikel bileşikleri) insanda kansere yol açtığı bilinen etkenlerin başında gelir. Akciğer kanserlerinin % 90'ının tartışmasız nedeni olan sigara aynı zamanda ağız boşluğu, farenks, larinks, özofagus ve daha başka organ kanserlerinde de önemli rol oynar. Sigaranın, tüm kanser ölümlerinin üçte birinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Bu, bir tek karsinojen ajanın ne denli etkili olabildiğini gösteren çarpıcı bir örnektir.

Diğer bazı karsinojenler mutasyon oluşturmak yerine hücre çoğalmasını uyararak kanser gelişimine katkıda bulunurlar. Bu tür maddelerin etkisiyle hücre bölünme hızında ortaya çıkan artış tümör gelişiminin erken aşamalarında çoğalma hızı yüksek bir hücre topluluğunun aşırı büyümesine neden



Şekil 19.6 Örnek kimyasal karsinojenlerin yapısı Aflatoksin fıstık ve tahıllarda bulunan küfler tarafından üretilen bir karsinojendir. Benzo(α)piren, dimetilnitrozamin ve nikel karbonil tütün dumanında bulunan karsinojenlerdir.

Bilgi İçin

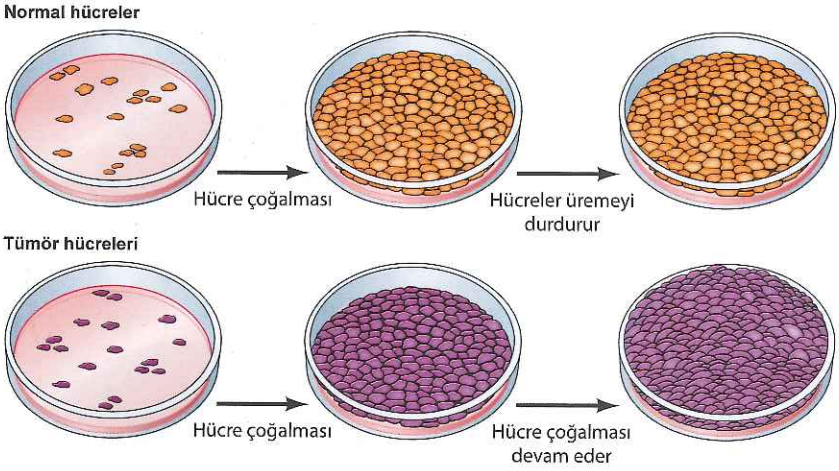
Heliobacter pylori ile mide ülseri arasında bağlantıyı ilk kuranlar Barry Marshall ile Robin Warren'dir. *H.pylori*'nin mide ülserinin nedeni olduğunu göstermek için Marshall kendini saf mikrop kültürü ile bilinçli olarak enfekte ederek enfeksiyonun seyrini izledi. Neyse ki hastalığı kendiliğinden iyileşti.

olduğundan bu tür maddelere **tümör kamçılayıcılar** (***tumor promoters***) denir. Buna ek olarak, tümör kamçılayıcılar tarafından uyarılan hücre proliferasyonu DNA replikasyonu sırasında kaçınılmaz bir şekilde oluşan mutasyonlara neden olur. Başta östrojenler olmak üzere hormonlar insan kanserlerinin gelişiminde önemli tümör kamçılayıcılardır. Örneğin, östrojen rahimde endometrium hücrelerinin çoğalmasını uyarır ve aşırı östrojen kadında endometrium kanseri gelişme olasılığını ciddi biçimde artırır. Bu yüzden, menopoz sonrasında uzun süreyle yalnız başına yüksek doz östrojen verilerek uygulanan hormon idame tedavisi endometrium kanseri riskini büyük ölçüde yükseltir. Bu nedenle östrojenin endometrium hücreleri üzerindeki çoğalmayı uyarıcı etkisini dengelemek için progesteron verilerek bu risk minimuma indirilir. Bununla birlikte, ağızdan alınan doğum kontrol ilaçları ve östrojen/progesteron kombinasyonları ile uygulanan hormon idame tedavisi meme kanseri riskini artırır. İnsanda tümör kamçılayıcı olarak etki eden diğer karsinojenler arasında asbest, kronik yangıya neden olan virüsler ve mide kanserine neden olan *Heliobacter pylori* sayılabilir.

Birçok değişik virüs türü de hem deney hayvanlarında, hem de insanda kansere neden olmaktadır. Virüslerin neden olduğu insan kanserlerinin başında, karaciğer ve serviks kanserleri gelir. Bu iki kanser birlikte, dünyada görülen kanserlerin %10-20'sini oluşturur. Virüs araştırmaları sadece insanlarda kanser nedeni oldukları için değil, aynı zamanda, ileride anlatılacağı gibi gerek viral, gerekse viral kaynaklı olmayan karsinojenlerin etkisiyle gelişen kanserlerden sorumlu moleküler olayların aydınlatılmasında önemli rol oynadıkları için büyük önem taşır.

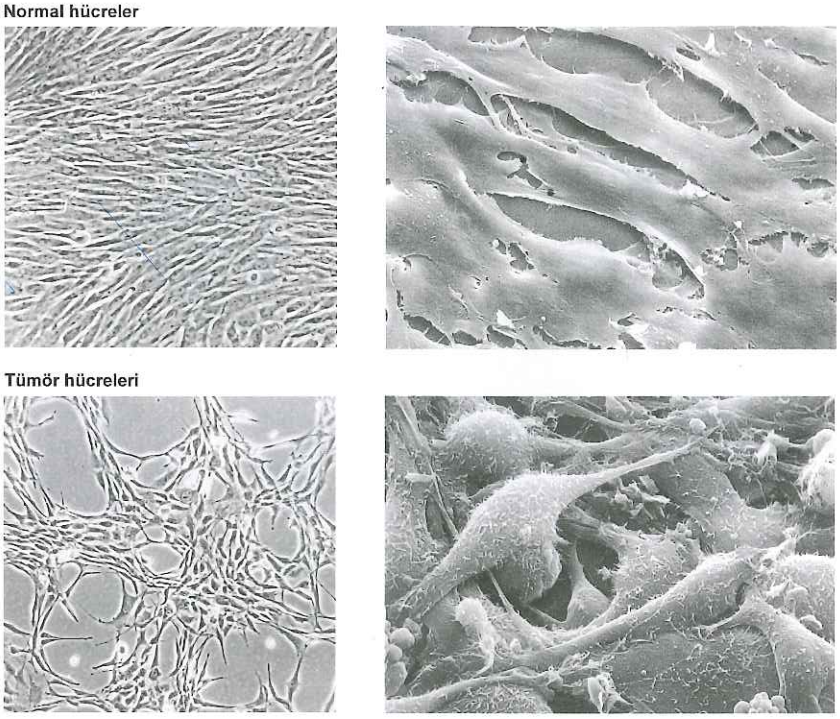
Kanser hücrelerinin özellikleri

Kanser hücresinin kontrolsuz çoğalması, daha önceki bölümlerde anlatılan ve hücrenin çoğalmasını düzenleyen mekanizmaları etkileyen değişikliklerin birikmesinin sonucudur. Kanser hücresinde ortaya çıkan ve onu normal eşdeğerinden ayıran bazı hücre davranış özellikleri de bu ilişkiyi yansıtır. Kanser hücrelerinde hücrenin normal çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen mekanizmalarda anormallikler görülür. Bütün bunlar bir araya geldiğinde, kanser hücresinin bu karakteristik özellikleri malinitenin hücresel düzeyde tanımlanmasını sağlar.



Şekil 19.7 Yoğunluğa bağlı inhibisyon Normal hücreler kültürde belirli bir yoğunluğa erişinceye kadar çoğalır ve bu yoğunluğa ulaştıklarında çoğalma durur. Buna karşılık tümör hücreleri yoğunluktan etkilenmeden çoğalmayı sürdürürler.

Kanser hücreleri, hücre kültüründe de, kontrolsüz *in vivo* çoğalma sırasında sergiledikleri davranışları taklit ederler. Kültür ortamında kanser hücreleri ile normal hücreler arasındaki ilk fark, normal hücrelerin çoğalmasının ve hareketinin, **yoğunluğa-bağlı inhibisyondan** ve **kontakt inhibisyondan** etkilenmesidir (**Şekil 19.7**). Normal hücreler kültür ortamında bulunan büyüme faktörlerinin miktarına ve komşu hücreler ile temastan kaynaklanan inhibisyona bağlı olarak, ancak belirli bir yoğunluğa erişinceye kadar çoğalırlar. Bu yoğunluğa ulaştıkları zaman çoğalmayı keserek sessiz faza geçer ve hücre döngüsünün G_0

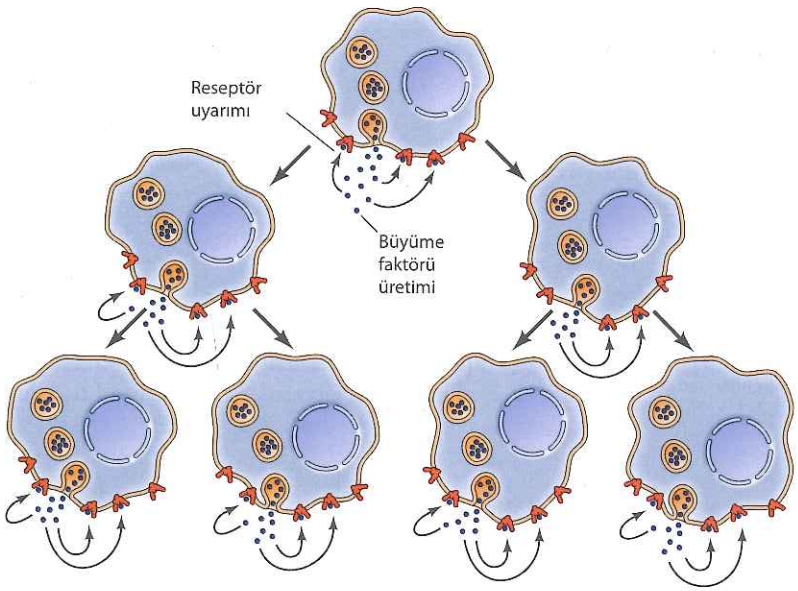


Şekil 19.8 Kontakt inhibisyon Normal fibroblastlar ile tümör hücrelerinin ışık mikroskobunda (solda) ve tarama elektron mikroskobunda (sağda) görünüşü. Normal fibroblastlar başka hücreler ile temas ettiklerinde ilerlemeye son vererek kültür kabının yüzeyinde yanyana, düzgün bir yapı oluştururlar. Tümör hücreleri ise kontakt inhibisyondan etkilenmeden birbirlerinin üzerine çıkarak, çok katlı, düzensiz yapılar oluşturur. (Lan Bo Chen, Dana Farber Cancer Institute)

evresinde dururlar (bkz. Şekil 17.5). Buna karşılık kanser hücrelerinin çoğalması ne büyüme faktörlerinin varlığından ne de hücrelerin birbiriyle temas etmesinden etkilenmez. Kanser hücreleri genel olarak normal hücrelerin çoğalmasını durduran sinyallere uyarak G_0 da durmak yerine, kontrolsüz *in vivo* çoğalma davranışlarını sürdürerek, kültürde yüksek yoğunluklara ulaşırlar. Benzer şekilde, normal fibroblastlar kültür kabında komşu bir hücre ile temas kuruncaya kadar ilerler ve bu noktada dururlar. Normal hücreler birbirine tutunarak kabın yüzeyinde düzenli bir hücre dizini oluşturur **(Şekil 19.8)**. Buna karşılık, tümör hücreleri komşu hücre ile temas kurduktan sonra da hareketlerine devam ederler, komşu hücrelerin üzerinden ilerleyerek düzensiz, çok katmanlı yapılar oluştururlar.

Animasyon 19.2
sites.sinauer.com/cooper7e/a19.2
Yoğunluğa Bağlı İnhibisyon
Normal hücreler kültürde sadece belirli bir yoğunluğa erişinceye kadar çoğalır, fakat tümör hücreleri hücre yoğunluğundan bağımsız olarak çoğalmaya devam eder.

Normal hücreler ile kanser hücreleri arasındaki bir başka fark da, birçok kanser hücresinin büyüme faktörleri olmadan da hem *in vivo,* hem de *in vitro* koşullarda kontrolsüz çoğalabilmesidir. Bazı durumlarda kanser hücreleri çoğalmaları için gerekli olan büyüme faktörlerini kendileri de salgılayabilir **(Şekil 19.9)**. Hücrenin gerek duyduğu büyüme faktörünün bu şekilde, kendisi tarafından salgılanması hücreyi sürekli olarak çoğalmaya uyarır **(otokrin çoğalma uyarımı).** Bu yüzden kanser hücreleri diğer normal, fizyolojik kaynaklardan gelen büyüme faktörlerine daha az gereksinim duyarlar. Kanser hücrelerinin büyüme faktörlerine bağımlı olmaması, bazı durumlarda hücre içi sinyal sistemlerinde gerçekleşen anormalliklerden, örneğin Bölüm 16'da anlatılan ve hücre çoğalmasını sağlayan sinyal yollarında görev yapan büyüme faktörü reseptörlerinin ya da (Ras pro-



Şekil 19.9 Hücre çoğalmasının otokrin uyarımı Hücre ve komşu hücreler ürettikleri büyüme faktörü tarafından uyarılarak durmadan çoğalır.

teinleri veya protein kinazlar gibi) başka proteinlerin kontrolsüz aktivitesinden kaynaklanır.

Kanser hücrelerinde hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi de daha düzensizdir. Yüzey adhezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalma nedeniyle kanser hücrelerinin çoğunun tutunma yeteneği normal hücrelere kıyasla daha düşüktür. Örneğin, karsinomların (epitelyal kanserler) gelişiminde epitel hücrelerindeki başlıca adhezyon molekülü olan E-kadherinin (bkz. Şekil 15.25) ortadan kalkması büyük önem taşır. Adhezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalma sonucunda, kanser hücreleri diğer hücreler ve doku bileşenleri ile etkileşime bağlı kısıtlamalardan kurtulur, bu da malin hücrelerin yayılma ve metastaz yapma yeteneğini artırır. Kanser hücrelerinin tutunma yeteneğinin azalması, morfolojik ve hücre iskeletinde değişikliklere de yol açar: Tümör hücrelerinin çoğu ekstraselüler matrikse veya komşu hücrelere iyi tutunamadıkları için normal hücrelerden daha yuvarlaktır.

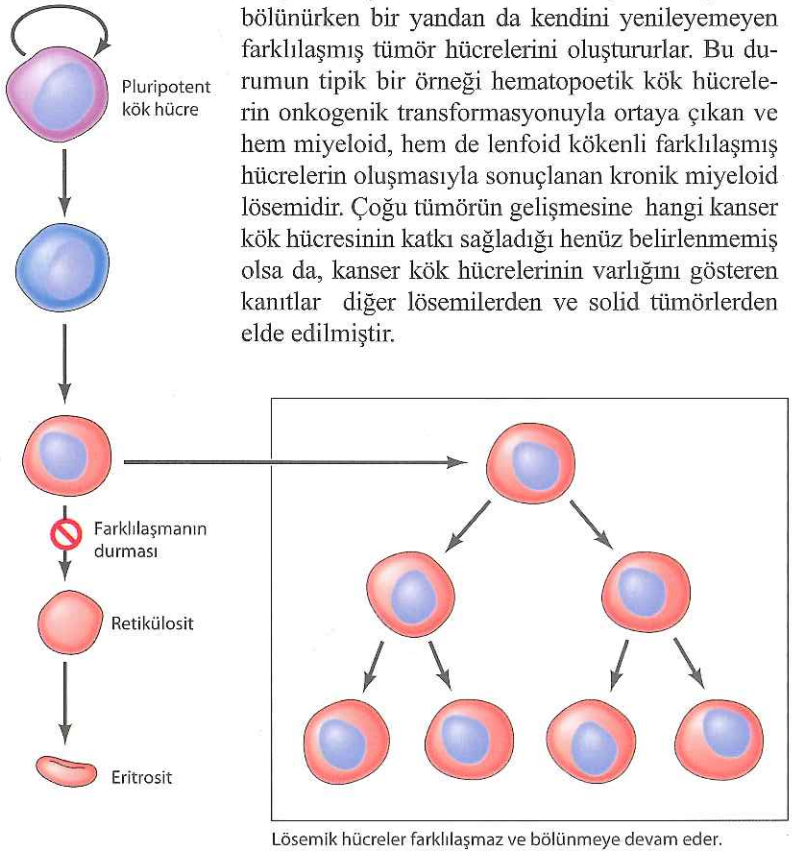
Kanser hücrelerinin başka doku bileşenleri ile etkileşimini değiştiren ve bu yüzden invazyon ve metastaz açısından önem taşıyan iki özelliği daha vardır. Bunlardan birincisi, malin hücrelerin ekstraselüler matriks bileşenlerini parçalayan ve böylece kanser hücresinin normal komşu dokunun içine girmesine olanak veren proteazlar salgılamasıdır. Örneğin, kollajeni parçalayan proteazların salgılanması, karsinomların bazal laminayı aşarak altındaki bağ dokusuna girebilmesi açısından önem taşır (bkz. Şekil 19.5). İkincisi, kanser hücreleri yeni kan damarlarının oluşumunu **(anjiyogenez)** uyaran büyüme faktörleri salgılarlar. Hücre sayısı bir milyonu aştığında, çoğalan hücrelere oksijen ve besin maddelerinin ulaşması ve tümörün büyümeye devam edebilmesi için yeni damarların oluşması gereklidir. Bu damarlar tümör hücresi tarafından salgılanan ve çevre dokulardaki kapillerlerin duvarlarındaki endotel hücrelerin çoğalmasını uyaran büyüme faktörlerine yanıt olarak ortaya çıkar ve sonuçta tümörün içine uzanan yeni kapillerler oluşur (bkz. Şekil 18.15). Yeni damarların oluşumu sadece tümörün büyümesi açısından değil, aynı zamanda metastaz açısından da önemlidir.

Tümör hücreleri anjiyogenik uyarı sonucunda gelişen yeni kılcallara kolayca girebildiğinden, bu olay kanser hücrelerinin dolaşıma katılmasına ve metastatik yayılımın başlamasına olanak sağlar.

Kanser hücrelerinin bir başka genel özelliği de normal biçimde farklılaşmamalarıdır. Bu farklılaşma kusuru anormal çoğalma ile yakından ilişkilidir, çünkü Bölüm 18'de anlatıldığı gibi birçok hücre tam olarak farklılaştıktan sonra artık çoğalmaz. Kanser hücreleri normal farklılaşma programını izlemek yerine, sürekli aktif biçimde çoğalmaları ile uyumlu olarak, farklılaşmanın erken aşamalarında kalırlar.

Farklılaşma kusuru ile malinite arasındaki ilişkinin en güzel örneğini lösemiler oluşturmaktadır. Farklı kan hücrelerinin tamamı, ortak bir hematopoetik kök hücreden türer (bkz. Şekil 18.18). Bu hücrelerden köken alan hücreler daha sonra belirli farklılaşma yolaklarını izlerler. Örneğin, bazı hücreler eritrositleri oluşturacak şekilde farklılaşırken başka hücreler de farklılaşarak, lenfosit, granülosit ve makrofajları oluşturur. Bütün bu hücre tiplerinde öncü hücreler farklılaşırken defalarca bölündükleri halde, tamamen farklılaştıkları zaman hücre bölünmesi de durur. Buna karşılık, lösemi hücreleri farklılaşamaz ve olgunlaşmanın erken aşamalarındaki bir durumda kalarak, bölünme ve çoğalma yeteneklerini sürdürürler **(Şekil 19.10)**.

Lösemilerde ve bazı solid tümörlerde çoğalma tümörde bulunan tüm hücrelerin çoğalması yerine kanser kök hücrelerin bir alt grubunun çoğalması suretiyle de gerçekleşebilir. Bu modelde kanser kök hücreleri (normal erişkin dokusundaki kök hücrelerde olduğu gibi; bkz. Şekil 18.17) bir yandan yeni kök hücreler oluşturacak şekilde bölünürken bir yandan da kendini yenileyemeyen farklılaşmış tümör hücrelerini oluştururlar. Bu durumun tipik bir örneği hematopoetik kök hücrelerin onkogenik transformasyonuyla ortaya çıkan ve hem miyeloid, hem de lenfoid kökenli farklılaşmış hücrelerin oluşmasıyla sonuçlanan kronik miyeloid lösemidir. Çoğu tümörün gelişmesine hangi kanser kök hücresinin katkı sağladığı henüz belirlenmemiş olsa da, kanser kök hücrelerinin varlığını gösteren kanıtlar diğer lösemilerden ve solid tümörlerden elde edilmiştir.



Şekil 19.10 Kusurlu farklılaşma ve lösemi Farklı tip kan hücreleri kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerden gelişir. Farklılaşmış hücreleri oluşturan öncü hücreler olgunlaşırken defalarca bölünürler, fakat farklılaşmanın son aşamasında hücre bölünmesi sona erer. Lösemi hücrelerinde farklılaşma, hücrenin sürekli çoğalmasına paralel olarak olgunlaşmanın erken aşamasında durur.

Bölüm 18'de anlatıldığı gibi, **apoptoz** ya da **programlı hücre ölümü,** kan hücreleri de dahil, birçok hücre türünde farklılaşmanın temel ögelerindendir. Kanser hücrelerinin çoğunda apoptoz görülmediğinden bu hücreler normal hücrelerden çok daha uzun yaşarlar. Kanser hücrelerinin programlı hücre ölümünden etkilenmemesi, tümör gelişimini önemli ölçüde hızlandırır. Örneğin, birçok normal hücrenin sağ kalması büyüme faktörlerinden ya da ekstraselüler matriksten gelen apoptozu engelleyen sinyallere bağlıdır. Tümör hücreleri ise normal hücrelerin gereksinim duyduğu faktörlerin yokluğunda bile kolayca sağ kalabilir. Normal çevresel sinyaller ortadan kalktığında tümör hücrelerinin apoptoza girmemesi, sadece primer tümörün gelişmesi açısından değil, metastatik hücrelerin vücudun başka bölgelerinde canlılıklarını korumaları ve çoğalmaları açısından da önemlidir. DNA hasarı gerçekleştiğinde normal hücreler apoptoza girdikleri halde kanser hücreleri bunu yapmaz. Kanser hücrelerinin apoptoza gidememesi, radyasyona ve DNA hasarına yol açarak etki eden kemoterapötik ilaçlara karşı direnç göstermelerine sebep olur. Bu nedenle anormal hücre sağ kalımı ve hücre proliferasyonu, kanser hücrelerinin bir canlıda sınırsız çoğalmasında rol oynayan başlıca etkenlerdir.

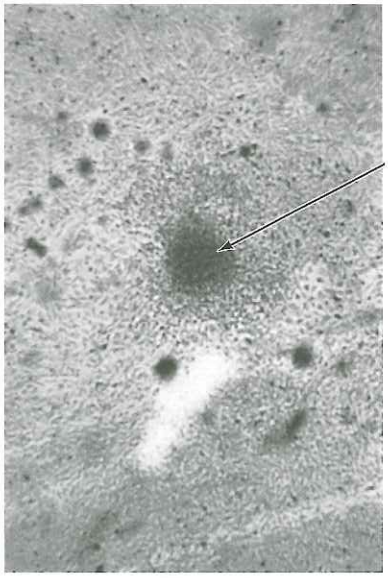
Kanser hücrelerinin sınırsız çoğalması normal hücrelerde hücre bölündükçe kısalan kromozom uçlarının kanser hücrelerinde korunmasını gerektirir. Ökaryot hücre kromozomlarının uçları (telomerler) telomeraz adı verilen özel bir enzim tarafından replike edilen tekrar dizilerinden oluşmaktadır (bkz. Şekil 7.16). Normal hücreler kromozom uçlarının yalnızca sınırlı sayıda bölünmesine yeterli olacak kadar telomeraz içerirler. Bunun sonucunda normal hücreler bölündükçe telomerleri kısalır ve sonunda replikasyon durur (yaşlanma), ya da hücre ölür. Buna karşılık, kanser hücreleri genelde yüksek düzeyde telomeraz ekspresyonu sayesinde sınırsız replikasyon yeteneği kazanır ve kromozom uçlarını sınırsız sayıda bölünmeye olanak verecek şekilde koruyabilirler.

Hücrelerin kültürde transformasyonu

Radyasyon, kimyasallar veya virüslerin etkisiyle tümör uyarımının çalışılabilmesi için, bir karsinojenik maddenin etkisinin tekrarlanabilir şekilde izlenmesi ve miktarının belirlenmesine olanak sağlayan deney sistemlerine gerek vardır. Karsinojenlerin etkisi hayvanlar üzerinde incelenebildiği halde bu deneylerin denetlenmesi ve kantitatif ölçümler yapılması güçtür. Bu yüzden normal hücrenin, kültürde tümör hücresine dönüşmesini (yani **hücre transformasyonu** işlemini) saptamaya olanak sağlayan *in vitro* test sistemlerinin geliştirilmesi kanser araştırmalarında önemli bir ilerleme olmuştur. Bu testler, normal hücrelerin kültür ortamında karsinojenik bir maddenin etkisine maruz bırakılmasıyla ortaya çıkan ve tümör hücrelerinin karakteristik *in vitro* çoğalma özelliklerini sergileyen, transforme olmuş hücreleri saptamak amacıyla planlanır. Bunların uygulanması, hücre transformasyonunun deneysel analizi sayesinde hayvan çalışmaları ile erişilemeyecek seviyede ileri bilgilere ulaşılmasına olanak sağlamıştır.

İlk ve en yaygın olarak kullanılan transformasyon testi, 1958 yılında Howard Temin ile Harry Rubin tarafından geliştirilen odak testidir. Odak testi, transforme olan hücrelerin, kültür kabının yüzeyindeki normal hücrelerin üzerinde morfolojik açıdan farklı, belirgin odaklar oluşturması esasına dayanır **(Şekil 19.11)**. Odak testinde kanser hücrelerinin morfolojik değişiklikler ile kontakt inhibisyonun kaybı ve yoğunluğa bağlı çoğalma inhibisyonunun ortadan kalkmasından yararlanılır. Sonuç, kültür plağındaki normal hücrelerin üzerinde çoğalan, morfolojik olarak değişikliğe uğramış hücrelerden oluşan

bir koloni oluşumudur. Bu şekilde ortaya çıkan transforme hücre odakları, karsinojenik madde uygulandıktan bir iki hafta sonra saptanabilir, *in vitro* ortamda transforme edilen bu hücreler duyarlı hayvanlara verildiğinde tümör oluşturabilirler. Bu da *in vitro* transformasyonun kanser hücrelerinin oluşumunu gösteren geçerli bir belirteç olduğunu destekler.



Şekil 19.11 Fokus testi Rous sarkoma virüsü ile transforme edilen tavuk embryo fibroblastlarının oluşturduğu bir odak (H. M. Temin ve H. Rubin, 1958. *Virology* 6: 669'dan alınmıştır).

Tümör Virüsleri

Tümör virüsü adı verilen ve değişik virüs ailelerine ait olan birçok virüs, deney hayvanlarında veya insanda doğrudan kanser oluşturabilir (Tablo 19.2). İnsanda kanser oluşturan virüsler Hepatit B ve C virüsleri (karaciğer kanseri), Merkel hücre polyoma virüsü (Merkel hücreli karsinom), papilloma virüsleri (serviks kanseri ve diğer anogenital kanserler), Epstein-Barr virüsü (Burkitt lenfoması ve nazofarenks karsinomu), Kaposi sarkomu-ilişkili herpes virüs (Kaposi sarkomu) ve bir retrovirüs olan insan T-hücre lenfotropik virüsüdür (erişkin T-hücreli lösemi). Ek olarak, HIV virüsü de AIDS'li hastalarda immün yetmezlik sonucunda gelişen kanserlerden dolaylı olarak sorumludur.

Daha önce de belirtildiği gibi tümör virüsleri, yalnız insanlarda hastalığa neden oldukları için değil, hücresel ve moleküler transformasyonun araştırılmasında model olarak da, kritik rol oynamıştır. Genomlarının küçük olması, tümör virüsleri üzerinde yapılan moleküler araştırmaları kolaylaştırmıştır. Böylece, kansere neden olan viral genler tanımlanabilmiş ve kanseri moleküler düzeyde anlamamıza yardım eden bugünkü bilgiler elde edilmiştir.

Hepatit B ve C virüsleri

Hepatit B ve **C virüsleri** dünyada kansere bağlı ölümler içinde üçüncü sırada yer alan karaciğer kanserinin başlıca nedenidir. Hepatit B ve C virüslerinin ikisi de karaciğer hücrelerini enfekte ederek uzun süreli kronik karaciğer enfeksiyonlarına neden olurlar. Bu türden kronik enfeksiyonlar yüksek karaciğer kanseri riski ile ilişkilidir ve kronik Hepatit B virüs enfeksiyonu taşıyan hastaların % 10-20'sinde, Hepatit C ile enfekte hastaların ise %5 kadarında karaciğer kanseri gelişir.

Tablo 19.2 Tümör Virüsleri

Virüs ailesi	İnsan tümörü	Genom boyutu (kb)
DNA Genomu		
Hepatit B virüsü	Karaciğer kanseri	3
SV40 ve polyomavirüs	Merkel hücreli karsinom	5
Papillomavirüsü	Serviks karsinomu	8
Adenovirüsler	Yok	35
Herpesvirüsler	Burkitt lenfoması, Nazofarenks karsinomu, Kaposi Sarkomu	100-200
RNA Genomu		
Hepatit C virüsü	Karaciğer kanseri	10
Retroviruslar	Erişkin T-hücreli lösemi	9-10

Bilgi İçin

Pap smear testi 1930'larda George Papanicolaou tarafından geliştirilmiştir. Uterus hücreleri toplanır ve bir mikroskop lamının üzerine yayılır. Kanser hücreleri değişik morfolojileri sayesinde mikroskop altında kolayca ayırt edilir.

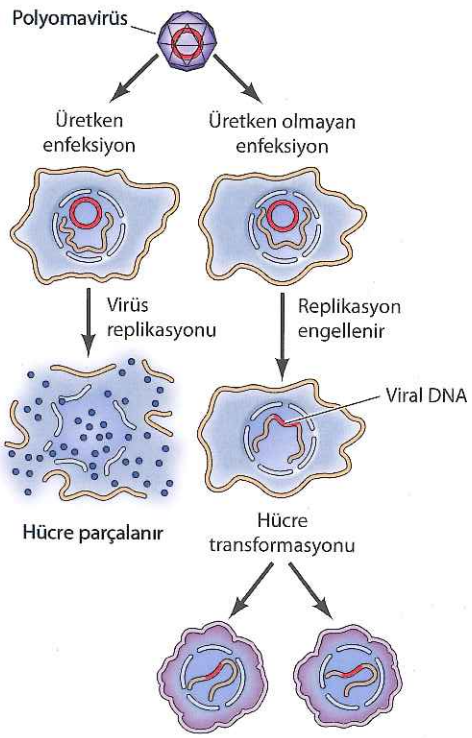
Hepatit virüslerinin karaciğer kanserine neden olmasını sağlayan mekanizmalar henüz bilinmemektedir. Hepatit B genomu sadece 3 kb boyunda olan bir DNA virüsüdür. Hepatit B virüsü ile gerçekleşen hücre transformasyonundan tümör baskılayıcı p53 proteinini inhibe eden ve hücre çoğalmasını uyaran birçok genin ekspresyonunu birden etkileyen (HBx adı verilen) bir viral proteinin sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Karaciğer hücrelerinin kronik doku hasarına ve yangıya bağlı olarak sürekli çoğalması Hepatit B virüsü ile uyarılan kanserlerin gelişmesine yardımcı olur. Hepatit C yaklaşık 10 kb'lık bir RNA virüsüdür. Kronik Hepatit C virüs enfeksiyonu görülen kişilerde, kronik yangıya cevap olarak gelişen hücre çoğalması kanser gelişimine büyük katkı sağlar. Bununla birlikte, bazı Hepatit C virüs proteinleri enfekte karaciğer hücrelerinin çoğalmasını doğrudan uyarması da mümkündür.

Küçük DNA tümör virüsleri

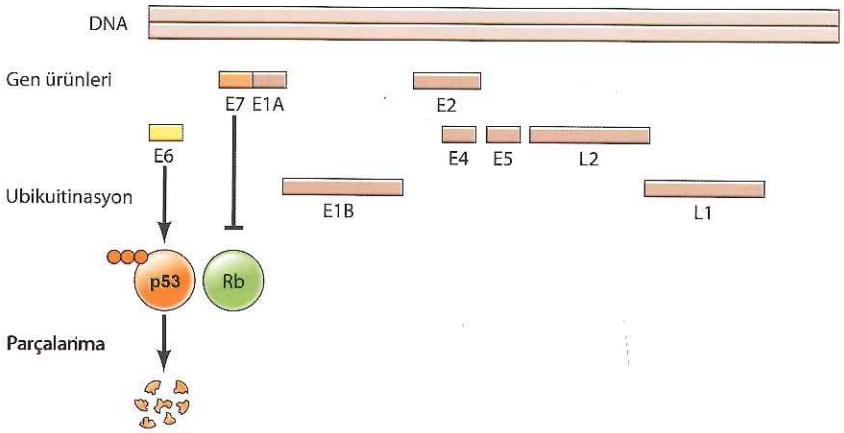
Küçük DNA tümör virüsleri, genomları 5 ile 35 kb arasında değişen birçok virüs ailesini (**polyomavirüsler**, **papillomavirüsler** ve **adenovirüsler**) kapsamaktadır. Papillomavirüsler insan kanserleri açısından önemli bir etkendir. İnsan papilloma virüslerinin değişik dokularda epitel hücrelerini enfekte eden yaklaşık 150 farklı tipi tanımlanmıştır. Bunların bazıları sadece (siğil gibi) benign tümörler oluştururken, bazıları da, başta serviks ve anogenital kanserler olmak üzere malin karsinomlara neden olmaktadır. ABD'de sürüntü alma (Pap smear) testinin sağladığı erken tanı ve kesin tedavi olanağı sayesinde serviks kanserinden ölüm oranı göreceli olarak düşüktür. En sık görülen insan papillomavirüs tiplerine karşı geliştirilen aşılar da serviks kanserinin önlenmesinde etkilidir. Buna karşılık, dünyanın başka bölgelerinde serviks kanseri oldukça sık görülür. Bu kanser, kadınlarda en sık görülen ikinci kanser türüdür ve dünyadaki tüm kanserlerin %5-10'unu oluşturur.

En yeni tanımlanan insan tümör virüsü 2008 yılında ender görülen bir deri tümörü olan Merkel hücreli karsinomda saptanan **Merkel hücre polyomavirüsüdür**. Diğer polyomavirüsler, SV40 ve adenovirüsler insan kanserleri ile ilişkili olmadıkları halde, hücre transformasyonunun moleküler temelinin anlaşılmasına model olması açısından büyük önem taşırlar. Genomlarının küçük olması ve gerek virüs replikasyonu, gerekse transformasyon için uygun hücre kültür testlerinin varlığı, bu virüslerin kanser araştırmalarında başarıyla kullanılmasını sağlamıştır.

Birçok polyomavirüs, SV40 ve adenovirüs doğal konak organizmalarının hücrelerinde tümör oluşturmaz ve transformasyona neden olmazlar. Bunun yerine, virüslerin replikasyonu, konak hücrenin parçalanmasına ve yavru virüs partiküllerinin çevreye dağılmasına neden olur (**Şekil 19.12**). Virüsün içinde çoğaldığı hücre, virüs replikasyonu sonucunda öldüğünden, transforme hale geçemez. Buna karşılık, virüsün transformasyon potansiyeli, virüsün replikasyonuna izin vermeyen hücreler enfekte olduğunda ortaya çıkar. Bu durum, konak hücrede virüs replikasyonu için gerekli faktörler bulunmadığı zaman ya da viral genom çoğalmak yerine hücre DNA'sının içine yerleştiğinde görülür. Virüs çoğalmasının olmadığı bu koşullarda belirli virüs genlerinin ekspresyonu enfekte hücrenin transformasyonuna yol açar.



Şekil 19.12 Polyomavirüs replikasyonu ve transformasyonu Virüsün hücrede çoğalabildiği durumlarda, enfeksiyon; virüsün replikasyonu, hücrenin parçalanması ve yeni oluşan virüs partiküllerinin çevreye yayılması ile sonuçlanır. Virüsün çoğalmasına olanak vermeyen hücrelerde, virüsün replikasyonu engellenir ve viral DNA parçaları konak hücre genomuna yerleşerek hücrenin transformasyonuna neden olur.



Şekil 19.13 İnsan papillomavirüs genomu Gen ürünleri erken (E: *early*) ve geç (L: *late*) olarak adlandırılır. Transformasyon E6 ile E7'nin etkisi sonucunda gerçekleşir. E6, p53'ünü ubikitinasyonu ve yıkımını uyarırken, E7 ise Rb'yi inhibe eder.

Hücre transformasyonuna neden olan viral genler litik enfeksiyonun (hücre lizisine yol açan) erken aşamasında eksprese olan genlerdir. Küçük DNA tümör virüslerinin genomu erken ve geç bölgelere ayrılır. Erken bölge, enfeksiyondan hemen sonra eksprese olur ve viral DNA sentezi için gereklidir. Geç bölge ise viral DNA replikasyonu başlayıncaya kadar eksprese olmaz ve virüs partikülünün yapısal bileşenlerini kodlayan genleri içerir. Litik enfeksiyon sırasında, erken bölge proteinleri virüs replikasyonu için gerekli birçok işlevi yerine getirir, konak hücrede gen ekspresyonunu ve DNA sentezini uyarırlar. Virüs replikasyonu konak hücrenin enzimlerine (örn., DNA polimeraz) bağımlı olduğundan, konak hücrenin uyarılması virüsün yaşam döngüsü açısından kritik önem taşır. Bölüm 18'de anlatıldığı gibi, hayvan hücrelerinin çoğu çoğalmadığından, viral DNA replikasyonunda gerekli olan enzimlerin sentezlenebilmesi için, bu hücrelerde bölünmenin uyarılması gerekmektedir. Erken genlerin ürünleri tarafından gerçekleştirilen bu çoğalma uyarısı, eğer viral DNA hücre genomuna kalıcı bir şekilde yerleşmiş ve virüs replikasyonunun bloklanmasına rağmen hücre içinde eksprese oluyorsa, transformasyona yol açabilir.

Küçük DNA virüslerinin erken bölge proteinleri, hücre çoğalmasını düzenleyen konak hücre proteinleri ile etkileşerek trasnformasyona yol açarlar. Örneğin, hücrenin papillomavirüsler ile transformasyonu iki erken bölge geni olan, *E6* ile *E7*'nin ekspresyonunun sonucudur **(Şekil 19.13)**. E6 ve E7 proteinleri birer tümör baskılayıcı olan ve hücre çoğalmasının düzenlenmesinde anahtar görev üstlenen konak hücre p53 ve Rb proteinlerine bağlanarak bunların işlevini engeller. E6, p53'ün ubikitine bağlı yıkımını hızlandırırken E7 de Rb'yi inhibe eder. SV40 ile adenovirüslerin transformasyona neden olan proteinleri de benzer şekilde, p53 ve Rb 'yi hedef alırlar. Bu durum söz konusu tümör baskılayıcı proteinlerin inaktivasyonunun hücre transformasyonunda anahtar rol oynadığını göstermektedir.

Herpesvirüsler

Genomları 100-200 kb arasında değişen **herpesvirüsler** en karmaşık virüs türlerindendir. Bazı herpesvirüsler kurbağa, tavuk ve maymun gibi hayvanlarda

Bilgi İçin

Uganda'da çalışan cerrah Denis Burkitt karşılaştığı çok sayıdaki baş-boyun tümörünün daha önce tanımlanmamış bir lenfoma türü olduğunu belirledi. Daha sonra Michael Epstein ve Yvonne Barr, Burkitt lenfoması dokusundan bir virüs izole ederek virüsler ile insan kanserleri arasındaki ilk ilişkiyi tanımladılar.

tümör oluşturabilirler. Ayrıca herpesvirüs ailesinin iki üyesi, **Kaposi sarkomu-ilişkili herpesvirüs** ve **Epstein-Barr virüsü** insan kanserleri ile de ilişkilidir. Kaposi sarkomu-ilişkili harpesvirüs, Kaposi sarkomunun gelişimi açısından kritik rol oynarken, Epstein-Barr virüsü de Afrika'nın bazı bölgelerinde Burkitt lenfoması, AIDS'li veya immün sistemi baskılanmış bireylerde B-hücreli lenfoma ve Çin'de nazofarenks karsinomu gibi insan tümörüyle ilişkilidir.

Epstein-Barr virüsü belirtilen insan tümörleri ile ilişkisi yanında, hücre kültüründe de insan B lenfositlerini transforme edebilir. Buna karşılık, biraz da genomunun karmaşıklığı nedeniyle, Epstein-Barr virüsünün replikasyon mekanizması ve transformasyona neden olma şekli tam olarak bilinmemektedir. Lenfositlerin transformasyonu için birçok viral genin etkisi gereklidir. Epstein-Barr virüsünün transformasyona neden olan başlıca proteini (LMP1), B hücrelerinin yüzey reseptörü gibi davranarak hücre çoğalmasını uyarır ve apoptozu engeller. Lenfositlerin transformasyonuna çok sayıda başka viral gen de katkıda bulunmakla birlikte bunların transformasyon açısından işlevi henüz aydınlanmamıştır.

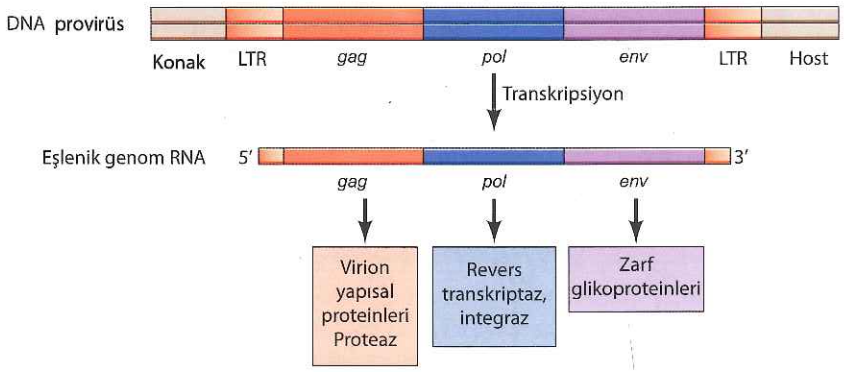
Kaposi sarkomu-ilişkili herpesvirüs DNA'sı, Kaposi sarkomu hücrelerinde bulunur ve bu tümörlerde hücre çoğalmasını ve sağ kalımını etkileyen çok sayıda viral gen de eksprese olur. Kaposi sarkomu hücrelerinin dikkate değer bir özelliği de tümör gelişimini hızlandıran değişik sitokinler ve büyüme faktörleri salgılamalarıdır. Kaposi sarkomu-ilişkili herpesvirüsün transformasyona neden olan proteinlerinin, kısmen de olsa büyüme faktörü salınımını arttırdıkları düşünülmektedir.

Retrovirüsler

Retrovirüsler, insan dahil, birçok canlıda tümör oluşturabilir. Bir retrovirüs olan insan T-hücre lenfotropik virüsü tip I (HTLV-I), Japonya, Karayibler ve Afrika'da sık görülen erişkin T-hücreli lösemisine neden olur. T lenfositlerinin HTLV-I etkisiyle transformasyonundan, hücrenin çoğalmasını denetleyen çok sayıda genin ekspresyonunu etkileyen bir protein kodlayan, viral *tax* geni sorumludur. AIDS'e de bir başka retrovirüs (HIV) neden olur. HTLV-I'in aksine HIV, normal hücreyi doğrudan kanser hücresine dönüştürerek kansere neden olmaz. Ancak, AIDS'li hastalarda, özellikle lenfoma ve Kaposi sarkomu başta olmak üzere, bazı kanser türlerinin sıklığı yüksektir. Bağışıklık sistemi baskılanmış diğer bireylerde de sık görülen bu kanserler, başka virüs enfeksiyonlarına bağlıdır (Epstein-Barr virüsü veya Kaposi sarkomu-ilişkili herpesvirüs gibi) ve AIDS'li hastalarda immün sistemdeki yetersizliğin sonucu olarak ortaya çıkarlar.

Retrovirüslerin onkojenik potansiyelleri cinslerine göre çok farklılık gösterir. Retrovirüslerin çoğunda, virüsün replikasyonu için gerekli olan ama transformasyonda rol oynamayan üç gen *(gag, pol* ve *env)* bulunur **(Şekil 19.14)**. Bu tür retrovirüsler çok ender durumlarda ve ancak provirüs DNA'sının, hücresel genlerin içine veya hemen yanına yerleşmesi ile ortaya çıkan mutasyonlar sonucunda kansere neden olurlar.

Bazı retrovirüslerde ise, hücre transformasyonuna yol açan ve etkin biçimde kanser oluşturan belirli genler bulunur. Yüksek düzeyde onkojenik bu retrovirüslerin en tipik örneği, ilk kez Peyton Rous tarafından 1911 yılında bir tavuk sarkomundan elde edilen **Rous sarkom virüsüdür (RSV).** RSV ile yapılan araştırmalar, bu virüsün izole edilmesinin üzerinden 50 yılı aşkın süre geçtikten sonra, tümör gelişiminin moleküler düzeyde birçok yönüyle anlaşılması açısından model oluşturan ilk viral onkogenin tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır.



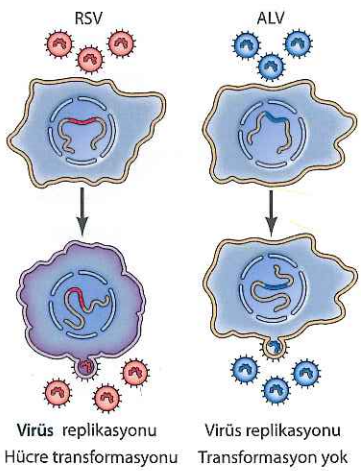
Şekil 19.14 Tipik bir retrovirüs genomu Hücre DNA'sına yerleşen provirüs DNA'sının transkripsiyonu sonucunda, tüm genoma eşlenik bir RNA molekülü oluşur. Bu molekül yeni virüs partikülleri için genomik RNA, *gag* ve *pol* genleri için ise mRNA görevi yapar. Uzun RNA molekülü kesilip-eklenerek, *env* geni için mRNA molekülü oluşturur, *gag* geni viral proteazı ve virüs partikülünün yapısal proteinlerini, *pol*, revers transkriptaz ile integrazı, *env* ise zarf proteinlerini kodlar.

Onkogenler

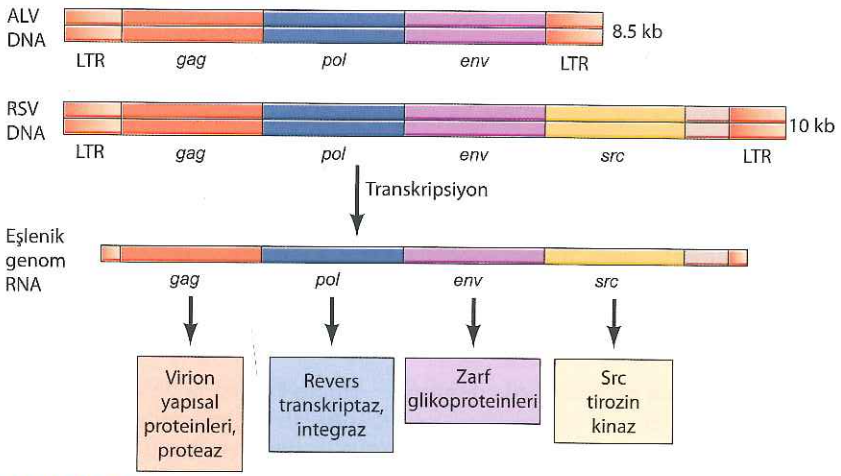
Kanser, hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını denetleyen kritik genlerde gerçekleşen değişikliklerden kaynaklanır. Tümör virüsleri ile yapılan araştırmalar, belirli genlerin (**onkogen** adı verilen) hücreleri transforme edebildiklerini göstererek, kanserin moleküler temelleri hakkında ilk bulguların elde edilmesini sağlamıştır. Buna rağmen insan kanserlerinin büyük çoğunluğu (yaklaşık %80'i) virüslerin etkisiyle değil, radyasyon ya da kimyasal karsinojenez gibi başka nedenlerle ortaya çıkar. Bu yüzden, viral onkogenler ile yapılan araştırmaların önemli bir yönü de, virüslere bağlı olmayan kanserlerin oluşumunda rol oynayan hücresel onkogenlerin, bu çalışmalarla belirlenmiş olmasıdır. Viral ve hücresel onkogenler arasındaki temel ilişki, onkojenik retrovirüsler üzerinde yapılan araştırmalar sayesinde tanımlanmıştır.

Retroviral onkogenler

Viral onkogenler ilk olarak, hücre kültüründe tavuk embryo fibroblastlarını transforme eden ve tavuklara verildiğinde 1-2 hafta içinde büyük sarkomlar oluşturan RSV'da tanımlanmıştır (Şekil 19.15). Buna karşılık, RSV ile yakından ilişkili tavuk lösemi virüsü (ALV), aynı hücrelerde transformasyona neden olmadan çoğalabilir, iki virüsün transformasyon yeteneği arasındaki bu fark, RSV'nin enfekte hücrelerin transformasyonundan sorumlu genetik materyal içerdiğine işaret etmiş, RSV ile ALV'nin genomlarının kıyaslanması bu hipotezi doğrulamıştır: RSV'nin genomik RNA'sı 10 kb, ALV'nin genomu ise daha küçük, yaklaşık 8.5 kb kadardır.



Şekil 19.15 RSV ve ALV ile hücre transformasyonu Gerek RSV, gerekse ALV tavuk embriyo fibroblastlarını enfekte ederek çoğalabilir, ancak, sadece RSV bu hücrelerde transformasyona neden olur.



Şekil 19.16 RSV ve ALV genomları RSV, ek olarak, Src protein-tirozinkinazı kodlayan *src* genine (ALV'de bulunmayan) sahiptir. Diğer üç retrovirüs geni (*gag*, *pol* ve *env*, bkz. Şekil 19.14) replikasyon için gereklidir, fakat transformasyonda rol oynamazlar.

Peter Vogt ile Steven Martin 1970'li yılların başlarında, RSV'nin transformasyona yol açmayan, delesyona uğramış ya da sıcaklığa duyarlı mutantlarını izole etmişlerdir. Bu mutant virüslerin enfekte ettikleri hücrelerde normal biçimde çoğalabilmeleri, RSV'nin replikasyon için gerekli olmayan ve doğrudan transformasyondan sorumlu genetik bilgileri içerdiğini göstermiştir. Yapılan analizler hem delesyon görülen, hem de sıcaklığa duyarlı mutant virüslerin etkisiyle, kanatlılarda tümör oluşumundan, kültürde ise fibroblastların transformasyonundan bir tek genin sorumlu olduğunu göstermiştir. RSV sarkomlara neden olduğu için, bu gene *src* adı verilmiştir, *src* geni RSV'nin genomuna fazladan eklenmiştir, ALV'de ise bulunmaz (**Şekil 19.16**). Bu genin kodladığı 60kd'luk protein, tanımlanan ilk protein tirozin kinazdır (Bölüm 9'daki Anahtar Deneye bakınız).

Tablo 19.3 Örnek Retroviral Onkogenler

Onkogene	Virüs	Türler
abl	Abelson lösemi	Fare
akt	AKT8	Fare
erbA	Kanatlı erithroblastozis-ES4	Tavuk
erbB	Kanatlı erithroblastozis-ES4	Tavuk
fos	FBJ fare osteogenik sarkom	Fare
jun	Kanatlı sarkomu-17	Tavuk
mos	Moloney sarcomu	Fare
myc	Kanatlı miyelokromatoz	Tavuk
p3k	Kanatlı sarkomu-16	Tavuk
raf	3611 fare sarkomu	Fare
rasH	Harvey sarkomu	Rat
rasK	Kirsten sarkomu	Rat
rel	Retiküloendoteliyoz	Hindi
sis	Simian sarkomu	Maymun
src	Rous sarkomu	Tavuk

Tavuk, hindi, fare, sıçan, kedi ve maymun gibi birçok değişik canlıdan 40'dan fazla farklı ve etkili onkojenik retrovirüs izole edilmiştir. Bunların hepsi RSV gibi, virüsün replikasyonu için gerekli olmayan ve transformasyona neden olan en az bir (bazıları iki) onkogen içerir. Bazı durumlarda değişik retrovirüsler aynı onkogeni içerebilmekle birlikte bu virüs grubundan iki düzineden fazla farklı onkogen izole edilmiştir (**Tablo 19.3**). *src* örneğinde olduğu gibi, bu genlerin çoğunun (**ras** ya da **raf** gibi) kodladıkları proteinler hücre çoğalmasını uyaran sinyal yollarının temel bileşenleridir (bkz. Şekil 16.28).

Proto-onkogenler

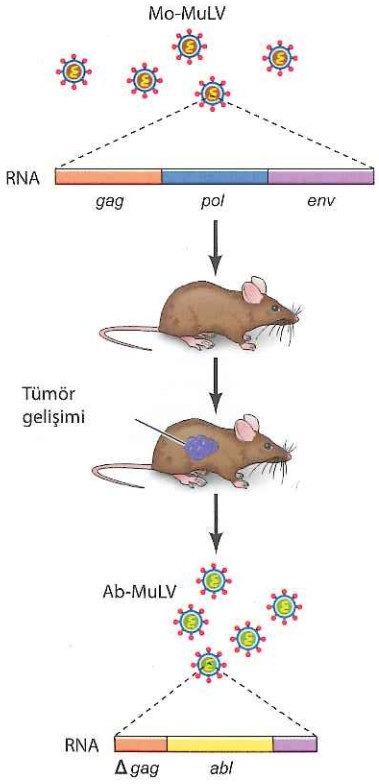
Retroviral onkogenlerin beklenmedik bir özelliği, virüs replikasyonu ile ilgili olmayışlarıdır. Bütün virüsler en etkin biçimde çoğalmak üzere programlandıklarından, viral onkogenlerin virüsün yaşam çevrimi için gerekli olmaması çelişkili bir durumdur. Bu yüzden bilim adamları retroviral onkogenlerin nereden geldiğini ve virüs genomuna nasıl yerleştiğini araştırmış ve bu araştırmalar sonunda insan kanserlerinde hücresel onkogenler tanımlanmıştır.

Onkogenlerin kökeni hakkındaki ilk ipucu, yüksek derecede onkojenik virüslerin izolasyon şeklinden elde edilmiştir. Abelson lösemi virüsü bunun tipik örneğidir **(Şekil 19.17)**. Yüz elliden fazla fareye, sadece replikasyon için gerekli *gag, pol* ve *env* genlerine sahip olan ve transformasyona neden olmayan bir virüs verildiğinde, bu farelerden birinde lenfoma gelişmiş ve bu lenfomadan, yeni ve değişik bir onkogen *(abl)* içeren, son derece onkojenik yeni bir retrovirüs (Abelson lösemi virüsü) izole edilmiştir. Bu güzlem retroviral onkogenlerin konak hücre genomundan türediği hipotezini doğrulamaktadır. Hücre proliferasyonunu yönlendiren bir konak hücre geni ender de olsa bir viral genoma dahil olarak, konak hücresinden köken alan bir onkogen ile, yüksek düzeyde onkojenik yeni bir virüs oluşturabilir.

Bu hipotezdeki kritik öngörü, normal hücrelerin de retroviral onkogenler ile yakından ilişkili, bunlara benzeyen genler içermesidir. Bu varsayım, 1976 yılında Harold Varmus, J. Michael Bishop ve arkadaşları tarafından, RSV *src* onkogenine özgü bir probun normal civciv hücrelerinde bulunan benzer diziler ile etkileştiğinin gösterilmesiyle kesin olarak doğrulanmıştır, *src* ile ilişkili dizilerin (insan dahil) birçok başka omurgalının genlerinde de bulunması, bu dizilerin evrim boyunca korunduğunu göstermektedir. Başka onkojenik virüslere özgü problarla yapılan deneylerin de benzer sonuçlar vermesiyle, retroviral onkogenlerin, normal hücrelerin benzer genlerinden türediği kesinlik kazanmıştır.

Retroviral onkogenlerin oluşmasına öncülük eden hücresel genlere **proto-onkogenler** adı verilir. Bunlar *(src, ras* ve *raf* gibi), hücrede önemli rol oynayan, genellikle hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev yapan genlerdir. Onkogenler ise, bu proto-onkogenlerin anormal eksprese olan veya mutant şekilleridir. Bu genlerde gerçekleşen değişiklikler sonucunda, onkogenler anormal hücre proliferasyonuna ve tümör gelişimine yol açarlar.

Bir retroviral genoma yerleşen onkogen, birçok yönüyle hücresel proto-onkogenden farklıdır. Öncelikle, viral onkogenin transkripsiyonu proto-onkogenin transkripsiyonunu düzenleyen normal diziler yerine, viral promotör ve güçlendirici dizilerin etkisiyle gerçekleşir. Bu yüzden onkogenler proto-onkogenlerden çok daha fazla miktarda ve bazen de, olmaması gereken hücrelerde eksprese olurlar. Bazı durumlarda gen ekspresyonundaki bu anormallikler



Şekil 19.17 Abelson lösemi virüsünün izolasyonu Onkogenik etkinliği yüksek olan Ab-MuLV virüsü, taransformasyona neden olmayan bir virüs (Moloney fare lösemi virüsü mo-MuLV) ile enfekte edilen bir farede gelişen ender bir tümörden izole edilmiştir. Mo-MuLV sadece virüs replikasyonu için gerekli olan *gag, pol* ve *env* genlerine sahiptir. Buna karşın, Ab-MuLV transformasyon aktivitesinden sorumlu olan yeni bir onkogen (*abl*) edinmiştir. *abl* onkogeni viral replikasyon genlerinden bazılarının (*pol* ve *env*) yerine geçmiş ve Abl-MuLV genomunda kısmen delesyona uğrayan *gag* geni (deltagag) ile füzyon oluşturmuştur.

Anahtar Deney

Proto-onkogenlerin Keşfi

DNA Related to the Transforming Gene(s) of Avian Sarcoma Viruses Is Present in Normal Avian DNA

Dominique Stehelin, Harold E. Varmus, J. Michael Bishop and Peter K. Vogt Department of Microbiology, University of California, San Francisco (DS, HEV, and JMB) and Department of Microbiology, University of California, Los Angeles (PKV)

Nature, Volume 260, 1976, pages 170-173

Bağlam

Rous sarkoma virüsünün (RSV) genetik incelenmesi, virüs replikasyonu için gerekli olmayan, ancak özgül olarak hücre transformasyonundan sorumlu bir gen olarak, ilk viral onkogeni (*src*) tanımlamıştır. Enfekte hayvanların tümörlerinden elde edilen yüksek onkojenite kazanmış retrovirüsler, retroviral onkogenlerin, konakçı hücrenin ilgili genlerinden köken aldığı şeklindeki hipotezin öne sürülmesini sağlamıştır. Bu öneriyle uyumlu olarak, farklı türlerin normal hücrelerinin, nükleik asit hibridizasyon testleriyle belirlenebilen retrovirüs-benzeri DNA dizilerine sahip oldukları bulunmuştur. Ancak, bu dizilerin, retroviral onkogenlere mi, yoksa virüs replikasyonunda görevli genlere mi ait olduğu anlaşılamamıştı.

Harold Varmus, J. Michael Bishop ve arkadaşları, *src* onkogeninin genetik özelliklerini ortaya çıkararak bu önemli konuyu çözümlediler. Öncelikle, Peter Vogt, *src* geninin tamamını ya da önemli bir kısmını kapsayan, yaklaşık 1.5kb delesyona sahip, transformasyon yapamayan RSV mutantlarını daha önceden izole etmişti. Stehelin ve çalışma arkadaşları, özel olarak *src* dizilerini simgeleyen bir cDNA prob üretmek için bu mutantlardan yararlandılar. Belirlenen bu probların, nükleik asit hibridizasyon deneylerinde kullanılması, normal hücrelerin *src*-benzeri DNA dizileri içerdiklerinin kesinlik kazanmasını sağladı.

Deneyler

Önce, RSV genomik RNA'sının tamamına komplementer olan, kısa tek iplikli DNA parçacıklarından oluşan radyoaktif bir cDNA probu sentezlemek için ters transkriptaz enzimi kullanıldı. Bu prob daha sonra, transformasyon yapamayan delesyon mutantından elde edilen fazla miktarda RNA ile hibridleştirildi. Viral replikasyon genlerine komplementer cDNA parçaları, transformasyon yapamayan RSV RNA'sına bağlanarak RNA-DNA ikili sarmalı oluşturdu. Buna karşın, *src* genine komplementer olan cDNA fragmanları hibridize olamadan tek iplikli yapılarını korudular. Daha sonra, *src* onkogen dizilerine özgül prob sağlamak üzere, bu tek iplikli DNA izole edildi. Transformasyon yapamayan RSV mutantlarındaki delesyonların boyutundan da tahmin edildiği gibi, *src* özgü probun RSV RNA'sında yaklaşık 1.5kb'lık bir bölgeye homoloji gösterdiği görüldü.

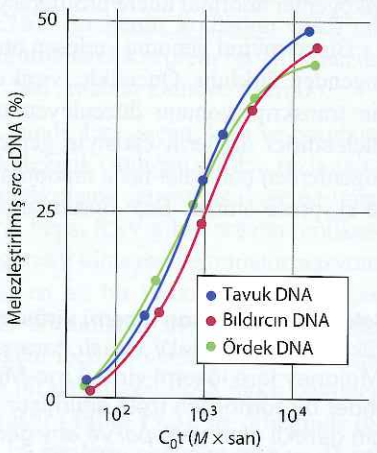
Radyoaktif *src* cDNA'sı daha sonra, normal kuş (avian) hücrelerinde benzer DNA dizilerini belirlemek amacıyla, hibridizasyon probu olarak kullanıldı. Çarpıcı şekilde, *src* cDNA'sı, normal tavuk DNA'sının yanı sıra diğer kanatlı türlerinin DNA'larına da büyük oranda hibridize oldu (bkz. şekil). Böylece, bu deneyler, normal hücrelerde src onkogenine önemli derecede benzeyen DNA dizileri bulunduğunu göstererek, retroviral onkogenlerin viral genoma katılan hücre genlerinden köken aldığı şeklindeki hipotezi destekledi.

Etki

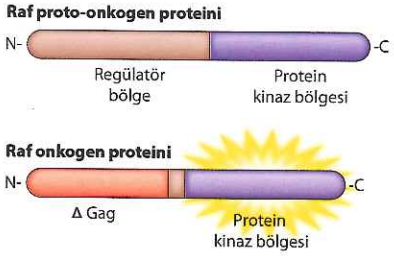
Stehelin ve arkadaşları 1976'da yayınlanan makalelerini, hücresel *src* dizilerinin "hücre çoğalması ve gelişiminde veya hücre davranışlarının fiziksel, kimyasal ya da viral etkenlerle transformasyonunda görevli olabilecekleri" olasılığını ortaya atarak sonlandırdılar. Bu öngörü etkin şekilde kanıtlanmış ve hücresel *src* dizilerinin keşfi, hem normal hücre çoğalmasının hem de insan kanserlerinin moleküler temellerinin anlaşılması için yeni bir kapı açmıştır. Src gibi onkogen ve proto-onkogen proteinleriyle yapılan çalışmalar, normal hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını denetleyen sinyal yolaklarının çözümlenmesinde kritik rol oynamıştır. Bunun da ötesinde, *src* proto-onkogeninin keşfi, viruslara bağlı olamayan tümörlerin, ilgili hücresel genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanabileceği fikrinin doğmasına ve doğrudan insan tümörlerinde onkogenlerin saptanmasına yol açmıştır. Varmus, Bishop ve arkadaşlarının, tümör virüsleri, normal hücreler ve virüslere bağlı olmayan tümörler ile yapılan çalışmaları birleştiren sonuçları, hücre düzenlenmesi ve kanser araştırmalarını hemen her yönden etkilemiştir.

J. Michael Bishop

Harold Varmus



src-özgü cDNA'nın, normal tavuk, bıldırcın ve ördek DNA'larına hibridizasyonu.



Şekil 19.18 Raf onkogen proteini Raf proto-onkogen proteini, amino ucunda bulunan düzenleyici bölge ile karboksi ucunda yer alan protein kinaz bölgelerinden oluşur. Viral Raf onkogen proteininde, düzenleyici bölge delesyonla uzaklaştırılmış ve yerini kısmen delesyona uğramış viral Gag dizilerine (delta gag) bırakmıştır. Sonuçta, Raf kinaz bölgesi sürekli aktif durumda kalır ve hücre transformasyonuna neden olur.

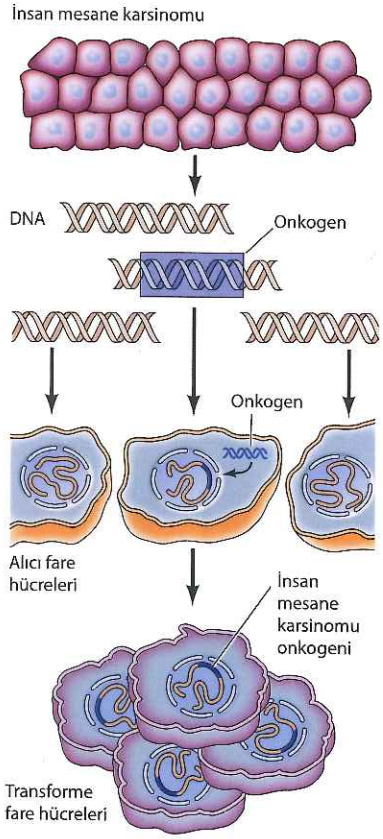
normal çalışan bir proto-onkogeni hücreyi tranformasyona götüren bir onkogen haline dönüştürmek için yeterlidir.

Gen ekspresyonundaki bu gibi değişikliklere ek olarak onkogenler, normal hücresel proteinlere kıyasla yapısal ve işlevsel açıdan farklılıklar gösteren proteinler kodlarlar. Birçok onkogen (örn., *raf)* amino ucunda viral diziler taşıyan bir birleşik proteinin sentezine neden olur **(Şekil 19.18)**. Bu tür birleşik proteinlerin oluşmasına yol açan rekombinasyon olayları çoğunlukla, proto-onkogenlerin virüslere geçişi sırasında gerçekleşir ve bu işlem sırasında proto-onkogenin hem amino, hem de karboksil ucu sıklıkla delesyona uğrar. Bu delesyonlar, proto-onkogenin aktivitesini düzenleyen düzenleyici bölgelerin kaybına, dolayısıyla, aktivitesi kontrol edilemeyen onkogen proteinlerinin ortaya çıkmasına neden olabilir. Örneğin, viral *raf* onkogeninin kodladığı birleşik proteinde, normal raf proteininin amino ucundaki diziler delesyon sonucu ortadan kalkmıştır. Proteinin amino ucundaki bu diziler, proteinin kinaz aktivitesinin düzenlenmesi açısından önemli olduğundan, delesyon, onkogen tarafından kodlanan Raf proteininin kontrolsüz (sürekli) aktivite göstermesine yol açar. Aşırı Raf akitivitesi, hücre çoğalmasını uyararak transformasyona neden olur.

Birçok başka onkogen de, ilişkili hücresel proto-onkogenden, onkogen ürününde tek bir amino asit değişikliğine yol açan bir nokta mutasyonu ile ayrılır. Bazı durumlarda bu tür amino asit değişiklikleri (daha önce anlatılan delesyonlar gibi), onkogen proteinlerinin denetimsiz aktivite göstermesine neden olur. Bir sonraki bölümde insan kanserlerindeki rolü anlatılan *ras* onkogeni, bu tür nokta mutasyonlarına önemli bir örnektir.

İnsan kanserlerinde onkogenler

Retroviral onkogenlerin hücresel genlerden geldiğinin anlaşılması, virüslere bağlı olmayan tümörlerin de proto-onkogenlerin mutasyon ya da DNA düzenlenmeleri sonucu değişime uğramasıyla ortaya çıkan hücresel onkogenlerden kaynaklanıp kaynaklanmadıkları sorusunu akla getirmiştir. İnsan tümörlerinde hücresel onkogenlerin etkinliğine ilişkin ilk bulgu, 1981 yılında Robert Weinberg ve Geoffrey Cooper (bu kitabın yazarlarından biri)'nin laboratuarlarında gerçekleştirilen gen transfer deneyleri ile elde edilmiştir. Bu deneylerde, insan mesane kanseri hücrelerinden elde edilen DNA'nın, kültür ortamında fare hücrelerini etkin biçimde transforme etmesiyle, insan tümörlerinin de biyolojik açıdan aktif bir hücresel onkogen içerdiği gösterilmiştir **(Şekil 19.19)**. Daha sonra, gerek gen transfer deneyleri, gerekse daha başka deneysel yaklaşımlar



Şekil 19.19 İnsan tümör onkogeninin gen transferi ile saptanması Fare hücreleri, kültürde, insan mesane karsinomu hücrelerinden elde edilen DNA ile transforme edildiğinde, transformasyonun insan tümöründen gelen bir onkogenin genoma yerleşerek eksprese olmasından kaynaklandığı görülmüştür.

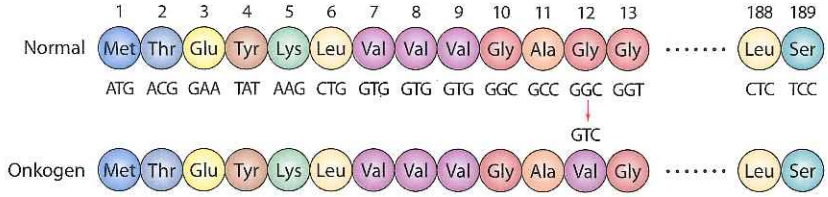
birçok farklı insan tümöründe aktif onkogenlerin varlığını ortaya koymuştur **(Tablo 19.4).**

İnsan tümörlerinde gözlenen onkogenlerin bir bölümü daha önce retrovirüslerde tanımlanmış olan onkogenlerin homoloğu iken, bir bölümü ise ilk kez insanlarda tanımlanan yeni onkogenlerdir. Gen transfer deneyleri ile ilk tanımlanan insan onkogeni, Harvey sarkom virüsünün (bkz. Tablo 19.3) insan homoloğu olan *ras*H onkogenidir. *ras* gen ailesinin birbiriyle yakından ilişkili üç üyesi (*ras*H, *ras*K ve *ras*N) insan tümörlerinde en sık görülen onkogenlerdir. *ras* genleri insan kanserlerinin yaklaşık %25'inde, kolon kanserlerinin %50'sinde ve akciğer kanserlerinin %25'inde rol oynar.

Ras onkogenleri tümör gelişimi sırasında normal hücrede bulunan proto-onkogenlerde gerçekleşen mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar. *ras* onkogeni ile hücresel proto-onkogen arasındaki tek fark, kritik bölgede gerçekleşen bir tek amino asit değişimidir. Belirlenmiş olan bu değişikliklerden ilki 12. kodonda glisin yerine valin geçmesidir **(Şekil 19.20)**. İnsan tümörlerinde, ras onkogeninde 12. (aynı zamanda 13. ve 61.) kodonlarda diğer amino asit değişikliklerine neden olan mutasyonlar da sık görülür. *ras* proto-onkogenini onkogene dönüştüren mutasyonların, kimyasal karsinojenlerin etkisiyle gerçek-

Tablo 19.4 İnsan Tümörlerinden Örnek Onkogenler

Onkogen	Kanser tipi	Aktivasyon mekanizması
abl	Kronik Myeloid Lösemi, Akut Lenfositik Lösemi	Translokasyon
bcl-2	Foliküler B-hücre lenfoması	Translokasyon
CCND1	Paratroid adenom, B-hücre lenfoması	Translokasyon
CCND1	Skuamoz hücreli, mesane, meme, özefagus, karaciğer ve akciğer karsinomu	Amplifikasyon
cdk4	Melanomlar	Nokta mutasyonu
CTNNB1	kolon karsinomu	Nokta mutasyonu
*erb*B	Gliomalar, karsinomlar	Amplifikasyon
*erb*B	Akciğer karsinomu	Nokta mutasyonu
erbB-2	Meme ve over karsinomları	Amplifikasyon
c-myc	Burkitt Lenfoması	Translokasyon
c-myc	Meme ve akciğer karsinomları	Amplifikasyon
L-*myc*	Akciğer karsinomu	Amplifikasyon
N-*myc*	Nöroblastom, akciğer karsinomu	Amplifikasyon
PDGFR	Kronik myelomonositik lösemi	Translokasyon
PDGFR	Gastrointestinal stromal tümörler	Nokta mutasyonu
PI3K	Meme karsinomu	Nokta mutasyonu
	Over, gastrik, akciğer karsinomları	Amplifikasyon
PML/RARα	Akut promiyelositik lösemi	Translokasyon
B-*raf*	Melanom, kolon karsinomu	Nokta mutasyonu
*ras*H	Tiroid karsinomu	Nokta mutasyonu
*ras*K	Kolon, akciğer, pancreas ve tiroid karsinomları	Nokta mutasyonu
*ras*N	Akut miyeloid ve lenfositik lösemiler, tiroid karsinomu	Nokta mutasyonu



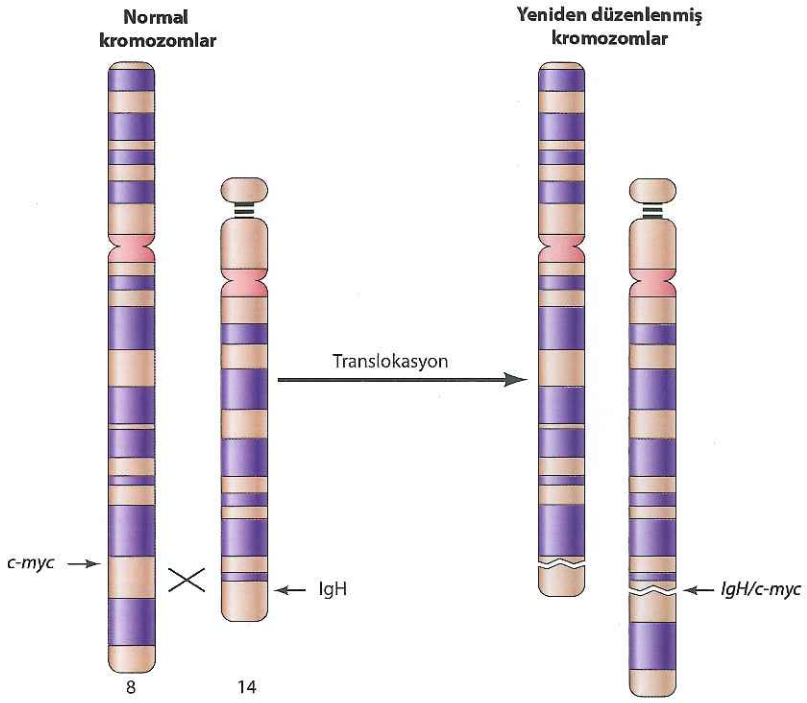
Şekil 19.20 ***ras* onkogeninde nokta mutasyonları** Mesane karsinom DNA'sında saptanan *ras*H onkogeninin transformasyon aktivitesinden, 12. kodonda GGC'nin (Gly) GTC'ye (Val) dönüşmesine neden olan, bir tek nükleotid değişikliği sorumludur.

leştiğini gösteren hayvan deneyleri karsinojenlerin mutajenik etkisi ile hücre transformasyonu arasında doğrudan bağlantı bulunduğunu ortaya koymuştur.

Bölüm 16'da anlatıldığı gibi, *ras* genleri birçok değişik büyüme faktörü reseptöründen gelen mitojenik sinyallerin iletiminde görev yapan, guanin nükleotid bağlayan proteinleri kodlar. Ras proteinlerinin aktivitesi GTP veya GDP bağlanmasına göre değiştiğinden, protein aktif (GTP-bağlı) ve inaktif (GDP-bağlı) durumlar arasında gidip gelir (bkz. Şekil 16.27). *ras* onkogenlerine özgü mutasyonlar, Ras proteininin sürekli olarak, GTP-bağlı aktif durumunu korumasına neden olur. Bu olay büyük ölçüde, normal Ras proteinine bağlı GTP'nin parçalanmasını uyaran GAP'a (GTPaz aktive eden protein) onkojenik Ras'ın yanıt vermemesinden kaynaklanır. Hücre içindeki GTPaz aktivitesinin azalması sonucunda, onkogenik Ras proteinleri aktif, GTP-bağlı durumda kalarak, hücrenin kontrolsuz çoğalmasını uyarır.

Nokta mutasyonları, proto-onkogenlerin onkogene dönüşme şekillerinden sadece biridir. Birçok kanser türünde kromozom yapısında translokasyon, duplikasyon ve delesyon gibi anormallikler de görülür. Kromozom translokasyonlarından kaynaklanan gen düzenlenmeleri, sıklıkla onkogenlerin ortaya çıkmasına yol açar. Bazı durumlarda bu düzenlenmelerin incelenmesi bilinen onkogenlerin varlığını gösterirken, bazı gen düzenlenmelerinin analizi ve moleküler klonlama deneyleriyle de yeni onkogenler bulunmuştur.

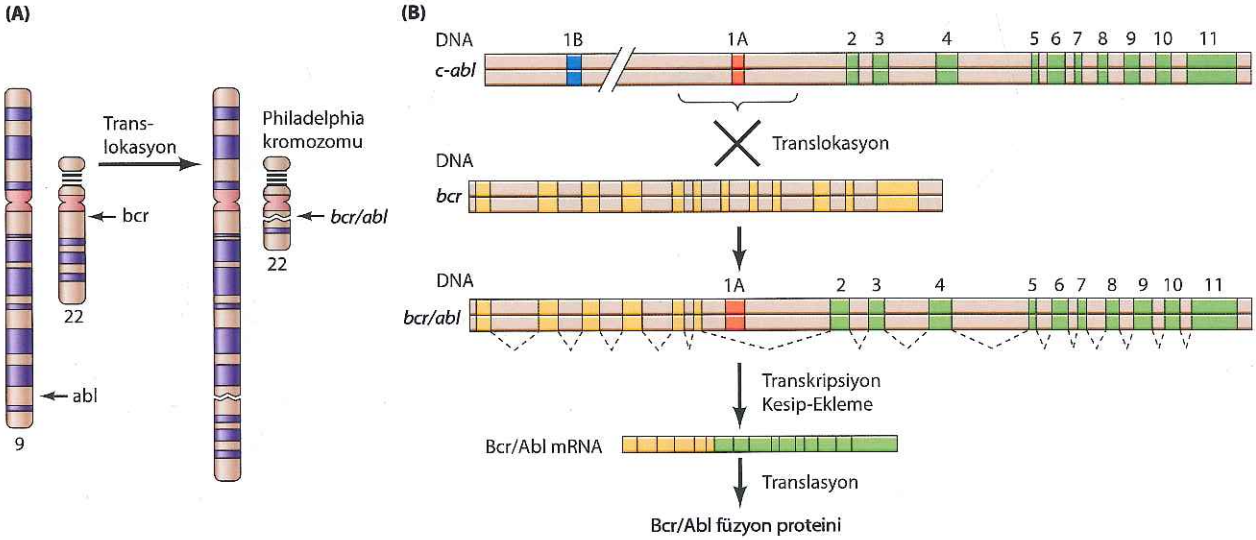
Kromozom translokasyonu sonucu onkogen aktivasyonuna ilişkin tanımlanmış ilk örnek ***c-myc*** geninin, antikor üreten B lenfositlerin tümörü olan insan Burkitt lenfoması ve fare plazmasitomlarındaki rolüdür (Şekil 19.21). Bu iki tümör de immünglobulinleri kodlayan genlerin



Şekil 19.21 ***c-myc* geninin translokasyonu** Burkitt lenfomasında translokasyon sonucunda 8. kromozomdan 14. kromozomdaki immünglobulin ağır zincir lokusuna (IgH) taşınan *c-myc* geninin aşırı ekspresyonu görülür.

translokasyonuyla tanımlanır. Örneğin, hemen tüm Burkitt lenfomalarında 8. kromozomun bir parçasının, translokasyon sonucu 2. kromozom (κ hafif zincir), 14. kromozom (ağır zincir) ya da 22. kromozom (λ hafif zincir) üzerindeki immünglobulin gen lokuslarından birine taşındığı görülür. Bu tümörlerde immünglobulin genlerinin aktif ekspresyonu, translokasyonun 8. kromozomdaki bir proto-onkogeni immünglobulin lokusuna sokarak aktive ettiğini göstermektedir. Bu olasılık, tümör örneklerinde bilinen onkogenlere özgü problar kullanılarak araştırılmış ve sonunda Burkitt lenfomasında 8. kromozom üzerindeki kırılma noktasında *c-myc* onkogeninin yer aldığı gösterilmiştir. Translokasyon sonunda *c-myc* geni bir immunglobulin lokusuna yerleşerek kontrolsüz biçimde eksprese olur. Normalde büyüme faktörü uyarısına yanıt olarak indüklenen bir transkripsiyon faktörünü kodlayan *c-myc* geninin bu şekilde kontrolsuz ekspresyonu, hücre çoğalmasının başlatılması için yeterli olmakta ve tümör gelişimine katkı sağlamaktadır.

Bazı proto-onkogenlerin translokasyonu da, genlerin protein kodlayan bölgesinde değişikliklere neden olarak, anormal gen ürünlerinin ortaya çıkmasıyla sonuçlanır. Bu tür transolokasyonların en tipik örneği, kronik myeloid lösemide 9. kromozomdaki ***abl*** proto-onkogeninin 22. kromozoma taşınmasıdır (**Şekil 19.22**). Bu translokasyon sonucunda *abl,* 22. kromozomdaki *bcr* geni ile birleşir. Sonuçta ortaya çıkan Bcr/Abl füzyon proteininde, normal Abl protoonkogen proteininin amino ucu, Bcr proteininin amino ucuna ait amino asit dizileri ile yer değiştirir.. Proteine Bcr dizilerinin eklenmesi, bir tirozin kinaz



Şekil 19.22 *abl*'nin translokasyonu (A) Kronik miyeloid lösemilerde (KML) *abl* onkogeni translokasyonla 9. kromozomdan 22. kromozoma taşınarak Philadelphia kromozomunu oluşturur. (B) İki alternatif birinci ekzona (1A ve 1B) sahip olan *abl* proto-onkogeni 22. kromozom üzerinde yer alan *bcr* geninin ortasına yerleşir. Translokasyon sonucunda ekzon 1B delesyona uğrar. Füzyon genin transkripsiyonu *bcr* promotöründen başlayarak *abl*'yi de kapsayacak biçimde devam eder. Daha sonra gerçekleşen kesilip-eklenme sonunda füzyon Bcr/Abl mRNA'sı oluşur. Bu mRNA'da *abl* ekzon 1A dizileri de delesyona uğramış ve *bcr* dizileri *abl*'nin ikinci ekzonu ile birleşmiştir. Bcr/Abl mRNA'sından rekombinant Bcr/Abl füzyon proteini sentezlenir.

olan Abl'nin kontrolsüz aktivitesine neden olarak, hücre transformasyonuna yol açar.

İnsan tümörlerinde onkogenlerin aktifleşme mekanizmalarından bir başkası da, genlerin yüksek düzeyde ekspresyonuna neden olan gen amplifikasyonudur. DNA amplifikasyonu (bkz. Şekil 7.40) tümör hücrelerinde, normal hücrelere kıyasla bin kattan daha fazla görülür ve onkogen amplifikasyonu birçok tümörün giderek daha hızlı büyümesine ve daha malin nitelikler kazanmasına neden olur. Örneğin, birçok değişik kanser türünde sıklıkla c-*myc* ile *myc* ailesinin başka iki üyesinin (N-*myc* ve L-*myc*) amplifikasyonu görülür. N-*myc* amplifikasyonu bazı nöroblastomalarda da gözlenir ve hızlı büyüyen, agresif tümörlerle ilişkilidir. Tirozin kinaz aktivitesine sahip bir reseptör kodlayan bir başka onkogen olan ***erb*B-2**'nin amplifikasyonu da hızlı seyreden meme ve over kanserleri ile ilişkilidir.

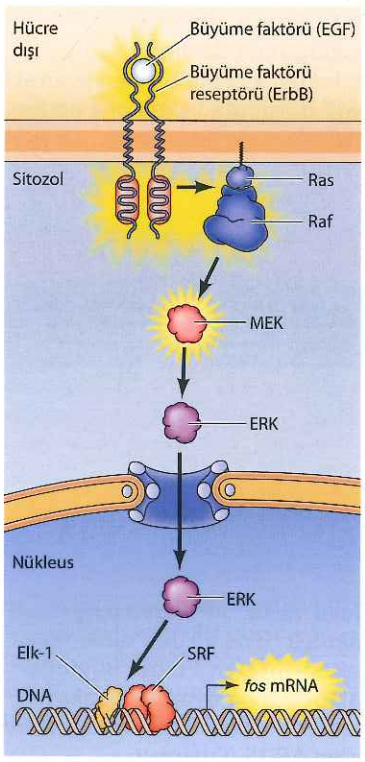
Onkogen ürünlerinin işlevleri

Viral ve hücresel onkogenlerin araştırılması sonucunda, malin hücrelerde anormal davranışlara neden olan çok sayıda (toplam 150 kadar) gen tanımlanmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi, proto-onkogenler tarafından kodlanan proteinlerin çoğu normal hücre çoğalmasını kontrol ederler. Bu durumda bu proteinlerin aşırı ekspresyonu ya da aktivitelerinde artış kanser hücresinin kontrolsüz çoğalmasına neden olur. Diğer onkogen ürünleri, kanser hücresinin programlı hücre ölümü sürecine girişte başarısız olması veya hatalı biçimde farklılaşması gibi davranışlar kazanmasına katkı sağlamaktadır.

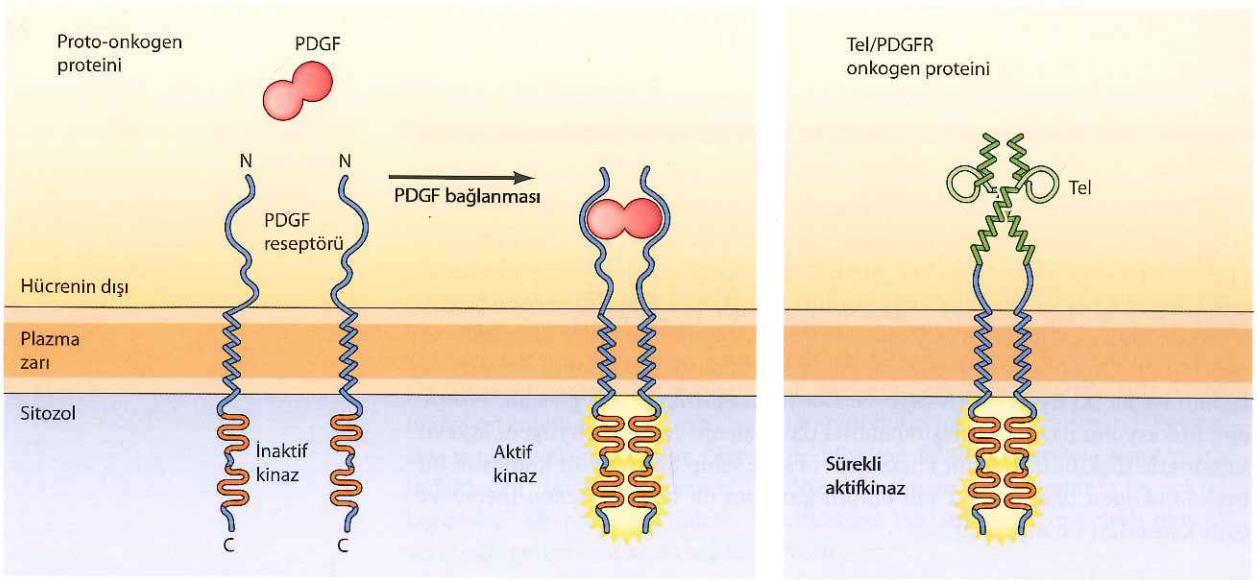
Onkogen proteinlerinin, büyüme faktörü uyarılarına yanıt veren sinyal yolaklarındaki görevleri, örneğin, reseptör tirozin kinazların uyarılmasıyla ERK sinyal yolağının **(Şekil 19.23)** aktifleşmesi, bu proteinlerin işlevinin hücre çoğalması açısından önemini işaret eder. Bu yolaktaki onkogen proteinleri arasında polipeptid büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, hücre içi sinyal yolaklarının üyeleri ve transkripsiyon faktörleri bulunur.

Büyüme faktörleri, aşırı eksprese olduklarında, birer onkogen proteini gibi davranabilirler. Bu durumda, tümör hücresi kendi ürettiği büyüme faktörlerine tepki gösterir. Sonuçta büyüme faktörünü sentezleyen hücre, otokrin olarak uyarılır (bkz. Şekil 19.9), bu da anormal hücre çoğalmasına neden olarak birçok insan tümörünün gelişmesine zemin hazırlar.

Onkogenlerin büyük bir bölümü, çoğunluğu protein-tirozin kinaz aktivitesi gösteren büyüme faktörü reseptörlerini kodlar. Bu reseptörlerin, normal koşullarda büyüme faktörlerinin bağlandığı, hücre dışında bulunan amino uçlarında gerçekleşen değişiklikler, bunların birer onkogen proteinine dönüşmesine neden olabilmektedir. Örneğin, bazı lösemilerde, kromozom translokasyonu sonucunda, trombosit (platelet) kökenli büyüme faktörü (PDGF) reseptörünün normal amino ucunun yerini, Tel adı verilen bir transkripsiyon faktörünün amino ucuna



Şekil 19.23 Onkogenler ve ERK sinyal yolağı Onkogen proteinleri büyüme faktörleri (EGF), büyüme faktörü reseptörleri (ErbB) ya da hücre içi sinyal molekülleri (ras, raf ve MEK) gibi davranabilir. Ras, Raf ve MEK onkogen proteinleri ERK MAP kinazı (bkz. Şekil 16.28. ve Şekil 16.29) aktifleştirerek transkripsiyonu düzenleyen başka onkogenik proteinleri kodlayan genlerin (örn. *fos*) uyarılmasına neden olur.

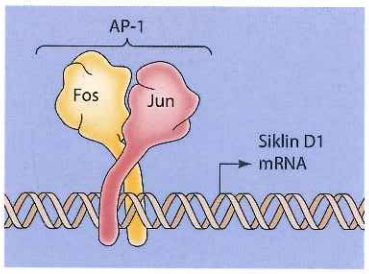


Şekil 19.24 Tel/PDGFR onkogen aktivasyonunun mekanizması Normal PDGF reseptörü (PDGFR) PDGF bağlanmasının uyardığı dimerleşme ile aktifleşir. Tel/PDGFR onkogeninin kodladığı füzyon proteinde, normal PDGFR molekülünün hücre dışındaki bölgesinin yerini Tel transkripsiyon faktörünün amino ucunda yer alan sarmal-ilmik-sarmal dimerleşme bölgesini de kapsayan diziler almıştır (bkz. Şekil 8.26D). Bu bölgeler PDGF yokluğunda da dimerleşir ve onkogenik protein kinazın sürekli aktif durumda kalmasına neden olur.

özgü diziler alır (Şekil 19.24). Bu şekilde oluşan onkojenik Tel/PDGF füzyon proteinindeki Tel dizileri, büyüme faktörü bağlanmasına ihtiyaç duymadan proteinlerin dimerler oluşturabilirler. Bunun sonucunda, hücre içindeki kinaz bölgesi sürekli aktif durumda kalır ve onkogen proteininden kontrolsüz bir biçimde çoğalma sinyalleri üretilir. Alternatif olarak, reseptör tirozin kinazları kodlayan genler, gen amplifikasyonu veya düzensiz kinaz aktivitesine neden olan nokta mutasyonları ile de aktive olabilmektedir. Reseptör olmayan tirozin kinazları kodlayan diğer onkogenler (*src* ve *abl* gibi) düzenleyici dizilerin delesyonu veya mutasyonu sonucunda sürekli olarak aktive olurlar.

Ras proteinleri, mitojenik sinyal yolunda büyüme faktörü reseptörlerini, Raf protein-serin/treonin kinazların aktivasyonuna bağlayan anahtar rolü üstlenirler. Bu işlem ERK MAP kinazların aktifleşmesiyle sonuçlanan protein kinaz kaskadını başlatır (bkz. Şekil 16.28). Daha önce de belirtildiği gibi, *ras* proto-onkogenini onkogene dönüştüren mutasyonlar, sürekli Ras aktivitesine yol açarak ERK sinyal yolunu aktifleştirir. raf ve MEK genleri de kontrolsüz protein kinaz aktivitesine neden olan mutasyonlar sonucunda onkogene dönüşerek ERK sinyal yolağının sürekli aktif kalmasıyla sonuçlanır.

ERK sinyal yolu, transkripsiyon faktörlerinin fosforillenmesi ve gen ekspresyonunda değişikliklerle sonuçlanır. Bu yüzden birçok onkogenin de, transkripsiyonu düzenleyen ve normal koşullarda büyüme faktörlerinin uyarısıyla aktifleşen proteinleri kodlaması beklenir. Örneğin, Elk-1'in ERK tarafından fosforillenmesi *fos* proto-onkogeninin transkripsiyonunu başlatır (bkz. Şekil 19.23). **Fos** ile, bir başka onkogen ürünü olan **Jun** birlikte transkripsiyon faktörü AP-1'i oluştururlar. Büyüme faktörleri tarafından uyarılan hücrelerde AP-1, hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (Şekil 19.25). Fos ya da Jun proteinlerinin kontrolsüz ekspresyonu yüzünden AP-1 in sürekli aktif kalması, transformasyona kadar uzanan anormal hücre çoğalmasını başlatmak için yeterlidir. Myc proteinleri de, mitojenik uyaranlara bağlı sinyal yollarında görev yapan transkripsiyon faktörlerindendir ve *myc* onkogeninin anormal ekspresyonu birçok insan tümörünün gelişmesinde rol oynar. İnsan lösemi ve lenfomalarında da, kromozom translokasyonları sonucunda daha başka transkripsiyon faktörleri onkogenlere dönüşerek aktifleşir.

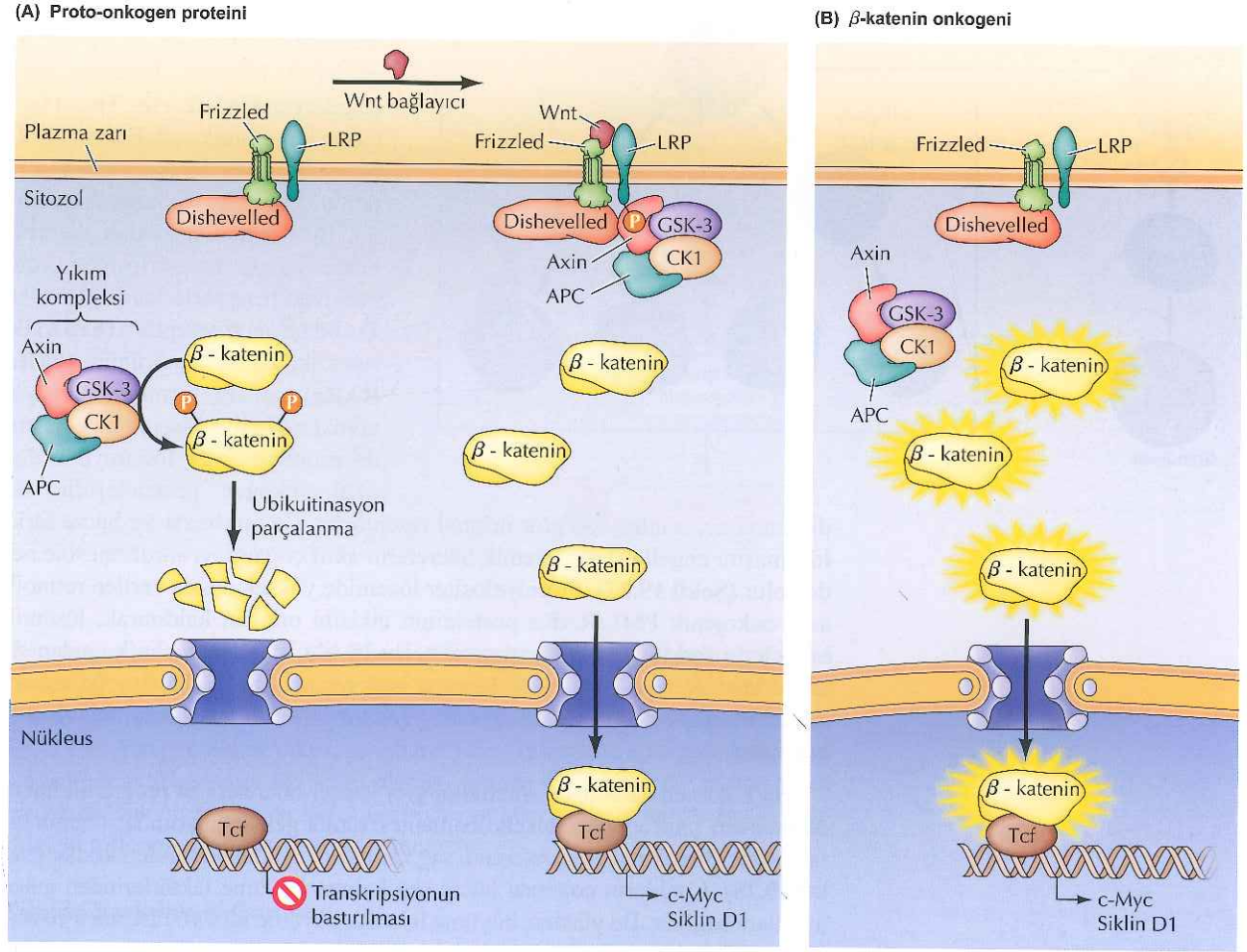


Şekil 19.25 AP-1 transkripsiyon faktörü Fos ve Jun dimerleşerek, siklin D1 ve diğer büyüme faktörlerince uyarılan başka genlerin transkripsiyonunu aktive eden AP-1'i oluşturur.

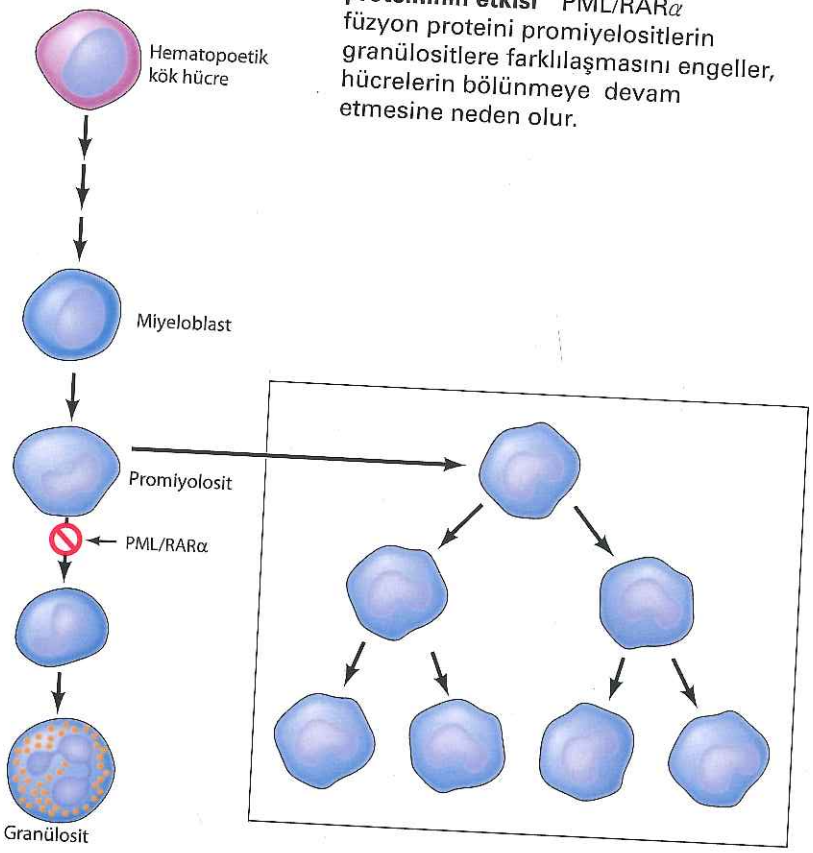
Büyüme faktörü uyarıları ile aktifleşen hücre içi sinyal iletim yolakları, sonunda hücre döngüsünün bileşenlerini düzenleyerek, G_1'deki kontrol noktasından geçişi sağlar. Büyüme faktörü uyarısına yanıt olarak (kısmen AP-1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu yoluyla), D-tipi siklinler uyarılır ve büyüme faktö-

ründen gelen uyarıyı hücre döngüsünün ilerlemesiyle eşleştiren anahtar görevini üstlenirler. Bu yüzden, kromozom translokasyonu ya da gen amplifikasyonu sonucunda aktifleşerek onkogene dönüşen siklin Dl'i kodlayan genin (***CCND1*** adı verilen) bir proto-onkogen olması şaşırtıcı değildir. Söz konusu değişiklikler, siklin Dl'in sürekli aktif durumda kalmasına ve hücre çoğalmasının büyüme faktörü yokluğunda da sürmesine neden olur. Siklin D1'in katalitik partneri olan cdk4 de melanomalarda nokta mutasyonları ile bir onkogene dönüştürülür.

Bölüm 16'da anlatılan G-proteinlerine bağlı sinyal yolakları, NF-κB, Hedgehog, Wnt ve Notch yolakları gibi diğer sinyal yolaklarının bileşenleri de onkogenler gibi davranabilirler. Örneğin, fare meme tümörlerinde Wnt proteinleri onkogen olarak tanımlanmıştır. İnsan kolon kanserlerinde Wnt sinyal yolunun hedefi olan β-katenin (*CTNNB1*) de gerçekleşen mutasyonlar sonucunda sıklıkla aktifleşerek onkogene dönüşür (**Şekil 19.26**). Aktifleştirici mutasyonlar ile kararlı hale gelen β-katenin Tcf ile kompleks kurarak hedef genlerin transkripsiyonunu



Şekil 19.26 β-katenin'in onkojenik aktivitesi β-katenin'in onkojenik aktivitesi (A) Normal hücrede, Wnt stimülasyonunun yokluğunda β-katenin; GSK-3 tarafından, kazeinkinaz-1 (CK1), aksin ve APC'den oluşan bir kompleks (yıkım kompleksi) içinde parçalanır. Wnt polipeptidleri Frizzled ve LRP reseptörlerine bağlanarak Dishevelled'in katkısı ile yıkım kompleksinin ayrışmasına ve β-katenin'in parçalanmadan kalmasına neden olur. β-katenin daha sonra çekirdeğe geçerek c-Myc ve siklin D1'i de kodlayan genleri içeren hedef genleri de baskılayan Tcf transkripsiyon faktörleri ile kompleks oluşturur ve onları baskılayıcı olmaktan aktivatör olmaya dönüştürür. (B) Wnt sinyalinin yokluğunda β-katenin'in yıkımını engelleyen mutasyonlar, geni onkogene dönüştürür.

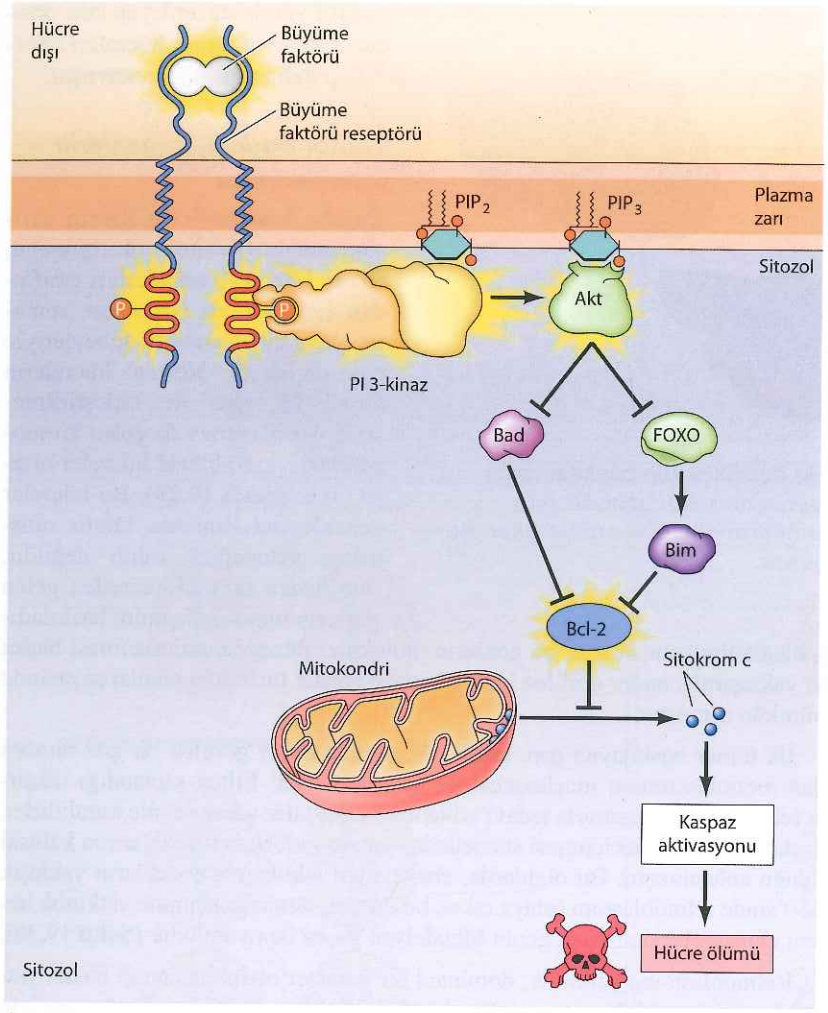


Şekil 19.27 PML/RARα onkogen proteininin etkisi PML/RARα füzyon proteini promiyelositlerin granülositlere farklılaşmasını engeller, hücrelerin bölünmeye devam etmesine neden olur.

başlatır. β-katenin/Tcf kompleksinin hedefi kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olan c-myc ve siklin D1 genleridir. Bu kapsamda Wnt sinyalinin normalde kolon kök hücrelerinin çoğalmasını uyararak hücrelerin yenilenmesini sağladığını belirtmek gerekir (bkz. Şekil 18.22). Bu durum, kolon kanserinin fizyolojik koşullarda kolon epitel hücrelerinin çoğalmasını sağlayan sinyal yolağının kendisinden kaynaklandığına işaret etmektedir.

Onkogenlerin çoğu hücre çoğalmasını uyardıkları halde, bazı transkripsiyon faktörleri onkojenik etkilerini, hücrenin farklılaşmasını engelleyerek gösterirler. Tiroid hormonu ile retinoik asit, Bölüm 16'da belirtildiği gibi, birçok hücre türünde farklılaşmayı başlatan faktörlerdir. Bu hormonlar zardan geçerek, hücre içinde transkripsiyonu düzenleyen reseptörlerine bağlanırlar. Tiroid hormon reseptörü **(ErbA)** ile retinoik asit reseptörünün **(PML/RARα)** mutant formları, sırasıyla tavuklarda eritrolösemiye ve insanda promiyelositer lösemiye neden olan onkogen proteinleridir. İki durumda da, mutant reseptör normal reseptörün işlevini bozar ve hücre farklılaşmasını engelleyerek lösemik hücrelerin aktif çoğalmayı sürdürmesine neden olur (Şekil 19.27). Promiyelositer lösemide yüksek dozda verilen retinoik asit, onkojenik PML/RARα proteininin etkisini ortadan kaldırarak, lösemik hücrelerin farklılaşmasını başlatabilir. Bu biyolojik gözlem klinik açıdan da önem taşır. Retinoik asit farklılaşmayı başlatan ve sürekli hücre çoğalmasını durduran etkisi nedeniyle akut promyelositer lösemili hastaların tedavisinde kullanılır.

Bu bölümde daha önce anlatıldığı gibi kanser hücrelerinin programlı hücre ölümünden, yani apoptozdan etkilenmemesi tümör gelişimi açısından önemli bir faktördür. Birçok onkogen hücrenin sağ kalmasını uyaran proteinleri kodlar (Şekil 19.28). Canlıların çoğunda hücre sağ kalımı, büyüme faktörlerinden gelen uyarılara bağlıdır. Bu yüzden, büyüme faktörü, büyüme faktörü reseptörü ve Ras gibi sinyal proteinlerini kodlayan onkogenler hücre proliferasyonunu uyarmak yanında, aynı zamanda hücre ölümünü de engeller. PI 3-kinaz/Akt sinyal yolu, Bölüm 18'de anlatıldığı gibi, büyüme faktörüne bağımlı birçok hücrede anahtar rol oynar. **PI 3-kinaz** ile **Akt** genleri hem retrovirüslerde, hem de insan tümörlerinde onkogen olarak etki gösterir. PI 3-kinaz/Akt sinyal yolağının aşağı yöndeki hedefleri arasında Bcl-2 ailesinin Akt fosforilasyonu ile aktifleşen, proapoptotik bir üyesi (Bad) ile (bcl-2 ailesinin proapoptotik üyesi Bim'in aktivitesini düzenleyen) FOXO transkripsiyon faktörü de yer alır. **Bcl-2,** ilk kez insan lenfomalarında

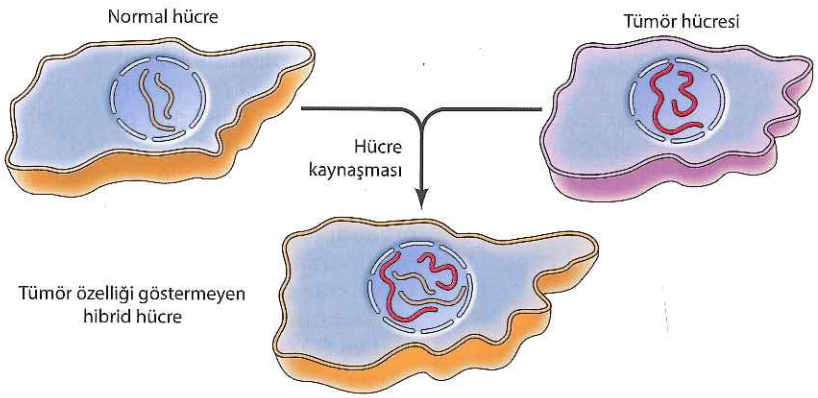


Şekil 19.28 Onkogenler ve hücre sağ kalımı Hücre sağ kalımını uyaran sinyal üreten onkogen proteinleri; büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, PI 3-kinaz, Akt ve Bcl-2 gibi proteinleri kapsamaktadır. Akt'ın hedefleri arasında Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyesi olan Bad ile bir başka proapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bim'in transkripsiyonunu uyaran FOXO transkripsiyon faktörü de yer alır. Akt tarafından fosforillenme Bad ve FOXO'nun her ikisini de inhibe ederek hücre sağ kalımını teşvik eder. Antiapoptotik protein olan Bcl-2 hücre sağ kalımını teşvik ederek onkogen olarak davranır ve mitokondriden sitokrom *c* salınımını engeller. Onkogenik potansiyele sahip olan proteinler parlak sarı işaretlenmiştir.

tanımlanan bir onkogendir. Bcl-2'nin yüksek oranda ekspresyonuna yol açan bir kromozom translokasyonu sonucunda, *bcl-2* onkogeni oluşur. Bcl-2, hücreyi ölüme götüren durumlarda apoptozu engelleyerek hücre sağ kalımını destekler. *Bcl-2*'nin onkogen olarak etkisi, programlı hücre ölümünün kanser gelişimi açısından önemini gösteren ilk bulgu olması yanında *C. elegans*'tan insana kadar birçok değişik organizmada *Bcl-2* ailesinde yer alan genlerin apoptozun kontrolündeki rollerinin aydınlatılmasını sağlamıştır.

Tümör Baskılayıcı Genler

Hücresel onkogenlerin aktivasyonu, tümör gelişmesi ile ilgili iki temel genetik değişiklikten birincisidir, diğeri, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonudur. Onkogenler, gen ekspresyonunu hızlandıran ya da kodladıkları proteinlerde kontrolsüz aktivite artışına neden olan genetik değişikliklerin sonucunda anormal hücre çoğalmasına neden olurlar. Tümör baskılayıcı genler ise, hücre çoğalmasının kontrolünde bunun tam tersi mekanizmayı simgeler, normal koşullarda hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskılarlar. Birçok tümörde bu genlerin hasar görmesi veya inaktive olması nedeniyle hücre çoğalmasını



Şekil 19.29 Hücre kaynaşmasıyla tümör özelliklerinin baskılanması Tümör hücrelerinin normal hücre ile kaynaşması sonucunda, iki hücreden de gelen kromozomları içeren hibrid hücreler ortaya çıkar. Bu hücreler genellikle tümör özellikleri taşımaz.

Video 19.3

sites.sinauer.com/cooper7e/v19.3

Tümör Baskılayıcı Genlerin Düzenlenmesi Tümör baskılayıcı gen ekspresyonunun kaybı kanser hücrelerinin bölünmemesi gerekirken bölünmesine neden olur.

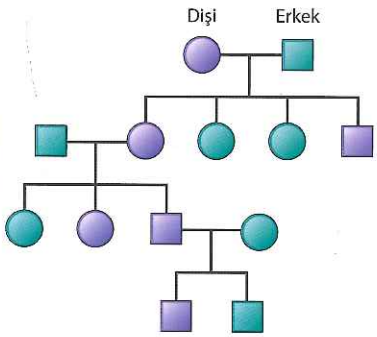
negatif yönde düzenleyen etki ortadan kalkar ve tümör hücreleri anormal çoğalma olanağına kavuşur.

Tümör baskılayıcı genlerin tanımlanması

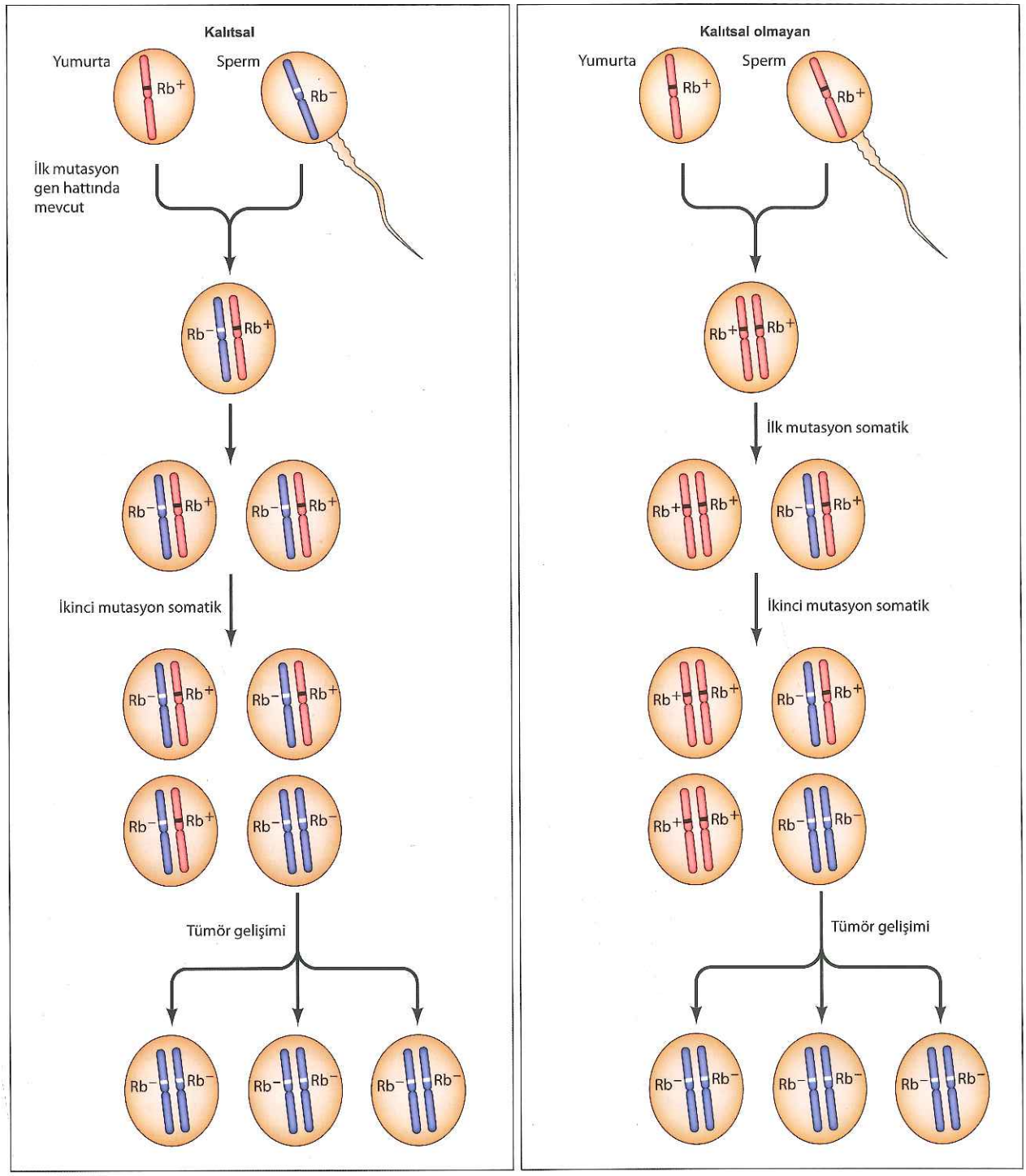
Tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonunu gösteren ilk bulgular, Henry Harris ve arkadaşları tarafından 1969 yılında başlatılan, somatik hücre hibridizasyon deneyleriyle elde edilmiştir. Normal hücrelerin tümör hücreleri ile birleştirilmesiyle, iki hücreden de gelen kromozomları içeren hibrid hücreler ortaya çıkar (Şekil 19.29). Bu hücreler genelde, hayvanlarda tümör oluşturma yeteneğine sahip değildir. Bu yüzden normal hücreden gelen genlerin tümör gelişimini baskıladığı düşünülmüştür. Ancak bu genlerin moleküler düzeyde tanımlanması başka bir yaklaşımla, ender görülen kalıtsal, insan kanser türlerinin analizi sayesinde mümkün olmuştur.

İlk tümör baskılayıcı gen, çocukluk çağında ender görülen bir göz tümörü olan retinoblastomun incelenmesi ile tanımlanmıştır. Erken saptandığı takdirde retinoblastom başarıyla tedavi edilebilir ve hastalar yaşar ve aile kurabilirler. Hasta ailelerinin incelenmesi sonucunda, bazı retinoblastom vakalarının kalıtsal olduğu anlaşılmıştır. Bu olgularda, ebeveynleri etkilenmiş çocukların yaklaşık %50'sinde retinoblastom ortaya çıkar, bu durum, tümör gelişimine yatkınlık nedeni olan tek bir dominant genin Mendelyan geçişi ile uyumludur (Şekil 19.30).

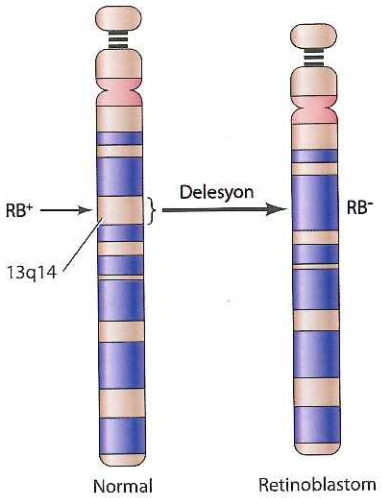
Retinoblastoma yatkınlık, dominant bir karakter olarak taşındığı halde, yatkınlık geninin varlığı normal retina hücresinin tümör hücresine dönüşmesi için yeterli değildir. Yatkınlık geni hastanın tüm retina hücrelerinde bulunduğu halde, bunların sadece bir bölümünde tümör gelişir. Bu yüzden tümör gelişimi için kalıtsal yatkınlık dışında daha başka olaylar da gereklidir. Alfred Knudson 1971 yılında retinoblastom gelişmesi için iki mutasyonun gerekli olduğu hipotezini ortaya atmıştır. Günümüzde bunun, normal bir diploid hücredeki homolog kromozomlar üzerinde yer alan yatkınlık geninin (***Rb*** tümör baskılayıcı geni) iki sağlam kopyasının da ortadan kalkması gerektiği anlamına geldiği bilinmektedir (Şekil 19.31). Kalıtsal retinoblastomda *Rb* geninin bir kusurlu kopyası genetik olarak kalıtılır. Genin bir kopyasının bu şekilde ortadan kalkması, tümör gelişimini başlatmak için tek başına yeterli değildir. Bu bireylerde, kalan normal *Rb* allelinin de işlevini yitirmesine neden olan ikinci bir somatik mutasyonun ortaya çıkması sonucunda retinoblastom gelişir. Etkilenmiş kişilerde her iki gözde de her bir tümörün ikinci bir bağımsız somatik mutasyon sonucu oluştuğu çoklu tümorler gelişir. Buna karşılık, kalıtsal olmayan retinoblastomun ortaya çıkması için, her iki *Rb* allelin de işlevini ortadan kaldıracak, birbirinden bağımsız iki



Şekil 19.30 Retinoblastom kalıtımı Retinoblastoma yatkınlık, bir sonraki kuşaktaki bireylerin yaklaşık %50'sinde ortaya çıkar. Hasta ve sağlam bireyler sırasıyla mor ve yeşil sembollerle gösterilmiştir.



Şekil 19.31 Retinoblastom gelişiminde *Rb* mutasyonları Kalıtsal retinoblastomda kalıtım yoluyla, etkilenmiş ebeveynden *Rb* geninin hatalı kopyası (Rb^-) gelir. Retina hücrelerindeki tek normal kopyada (Rb^+) gerçekleşen yeni bir mutasyon bu kopyanın da ortadan kalkmasına neden olarak hastalığı başlatır. Nadir görülen kalıtsal olmayan olgularda genin ebeveynlerden gelen iki kopyası da sağlam olduğundan, hastalık ancak somatik mutasyonlar sonucunda aynı hücrede iki *Rb* kopyasının birden inaktive olmasıyla ortaya çıkabilir.



Şekil 19.32 Retinoblastomda *Rb* delesyonu Birçok retinoblastom hastasında *Rb* geninin bulunduğu kromozom lokusunda (13q14) delesyonlar görülür.

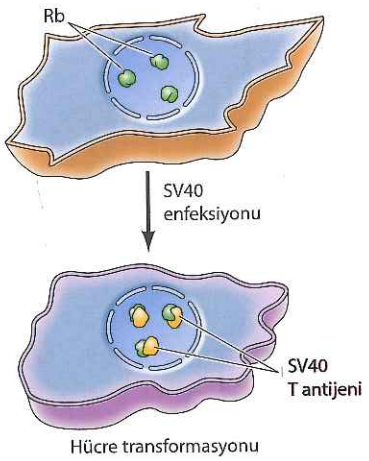
ayrı somatik mutasyonun gerçekleşmesi gerektiğinden, hastalığın bu şekli oldukça ender görülür.

Rb geninin tümör oluşumunda negatif düzenleyici olarak oynadığı işlevsel rol, ilk olarak kromozom morfolojisi gözlemleri ile fark edilmiştir. Bazı hastalarda, kromozom 13ql4 bölgesinde görülebilir delesyonların saptanması, tümör gelişmesinden *Rb* geninin kaybının (aktivasyonun değil) sorumlu olduğuna işaret etmiştir (Şekil 19.32). Daha sonraki gen haritalama çalışmalarıyla, tümör gelişiminin tümör hücrelerindeki normal *Rb* allellerinin ortadan kalkmasına bağlı olduğunun gösterilmesi, *Rb*'nin bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev gördüğünü doğrulamıştır. Sonunda, 1986 yılında *Rb* geninin klonlanması ile, retinoblastomlarda *Rb* geninin mutasyona uğradığı ya da ortadan kalktığı gösterilmiştir. Gen aktarımı deneyleriyle retinoblastom hücrelerine genin normal kopyası verildiğinde, tümör hücresine özgü özelliklerin kaybolması, *Rb*'nin tümör baskılayıcı olarak aktivite gösterdiğini kesin olarak kanıtlamıştır.

Rb, ender görülen bir çocukluk çağı tümöründe saptanmakla birlikte, daha sık görülen erişkin tümörlerinde de rol oynar. Klonlanan gen ile yapılan çalışmalar; mesane, meme ve akciğer kanserlerinin birçoğunda da Rb'nin ortadan kalktığını ya da inaktive olduğunu göstermiştir. Bu yüzden, *Rb* 'nin tümör baskılayıcı gen olarak öneminin retinoblastom ile sınırlı olmadığı, sık görülen kanser türlerinin birçoğunda da rol oynadığı düşünülmektedir. Bütün bunlara ek olarak, bu bölümde daha önce de belirtildiği gibi, Rb proteini, SV40, adenovirüsler ve insan papillomavirüsler gibi çok sayıda DNA tümör virüsünün onkojenik proteinlerinin başlıca hedefidir (Şekil 19.33). Bu proteinler Rb'ye bağlanır ve aktivitesini baskılar. Bu yüzden bu virüsler ile transformasyon, *Rb* geninin mutasyonu yoluyla değil, Rb'nin protein düzeyinde inaktivasyonu sonucunda gerçekleşir.

Rb'nin tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanması birçok değişik kanser türü ile ilişkili yeni tümör baskılayıcı genlerin saptanması için örnek oluşturmuştur (Tablo 19.5). Bu genlerin bazıları, ender görülen kalıtsal kanserlerin nedeni olarak Rb'nin retinoblastomda oynadığı role benzer rol oynarken, başka tümör baskılayıcı genler de erişkinlerde sık görülen ve kalıtsal nitelik taşımayan (kolon kanseri gibi) kanser türlerinde sıklıkla mutasyonu ya da delesyonu gözlenen genler olarak ortaya çıkmıştır. İki durumda da, birçok tümör baskılayıcı genin hem kalıtsal, hem de kalıtsal olmayan kanser türlerinin ortaya çıkmasında rol oynadığı görülmektedir. Gerçekten, tümör baskılayıcı genlerde ortaya çıkan bazı mutasyonlar, insanda tümör gelişimine neden olan moleküler değişiklikler içinde, en sık görülenlerdendir.

İkinci olarak tanımlanan tümör baskılayıcı gen; lösemi, lenfoma, sarkom ve beyin tümörleri ile meme, kolon ve akciğer karsinomları gibi birçok değişik insan kanserinde sıklıkla işlevini kaybettiği görülen ***p53*** tür. Toplam olarak *p53* mutasyonları kanserlerin yaklaşık %50'sinde rol oynuyor olması, *p53* genini insan kanserlerinde görülen genetik bozuklukların en yaygın hedefi haline getirmektedir. Ayrıca, p53'ün kalıtsal mutasyonları, etkilenmiş bireylerde birkaç farklı kanser türünden birinin geliştiği nadir kalıtsal kanser sendromlarının



Şekil 19.33 *Rb*'nin DNA tümör viruslarının proteinleri ile etkileşimi Birçok DNA virüsünün onkogen proteinleri (örn., SV40T antijeni) *Rb*'ye bağlanıp aktivitesini engelleyerek transformasyona neden olur.

Tablo 19.5 Örnek Tümör Baskılayıcı Genler

Gen	Kanser tipi
APC	Kolon/rektum karsinomu
BRCA1	Meme ve over karsinomları
BRCA2	Meme karsinomu
INK4	Melanom, akciğer karsinomu, beyin tümörleri, lösemiler, lenfomalar
p53	Beyin tümörleri; meme, kolon /rektum, ösefagus, karaciğer ve akciğer karsinomları; sarkomlar; lösemi ve lenfomalar
PTCH	Bazal hücreli karsinom
PTEN	Beyin tümörleri; melanom; prostat, endometriyal, böbrek ve Akciğer karsinomları
Rb	Retinoblastom; sarkomlar; mesane, meme ve akciğer karsinomları
Smad2	Kolon/rektum karsinomları
Smad4	Kolon/rektum karsinomu, pankreatik karsino
TβRII	Kolon/rektum karsinomu, gastrik karsino

Bilgi İçin

Gen transfer deneyleriyle transformasyona uğratılan birçok kanser hücresinde mutant *p53* geni gözlendiğinden *p53*'ün başlangıçta onkogen olduğu düşünülmüştür. Daha sonraki araştırmalar *p53*'ün aslında tümör baskılayıcı olduğunu göstermiş ve birçok tümörde bulunan mutant *p53* geninin normal *p53*'ün işlevini dominant negatif biçimde baskılayarak transformasyona neden olduğu anlaşılmıştır.

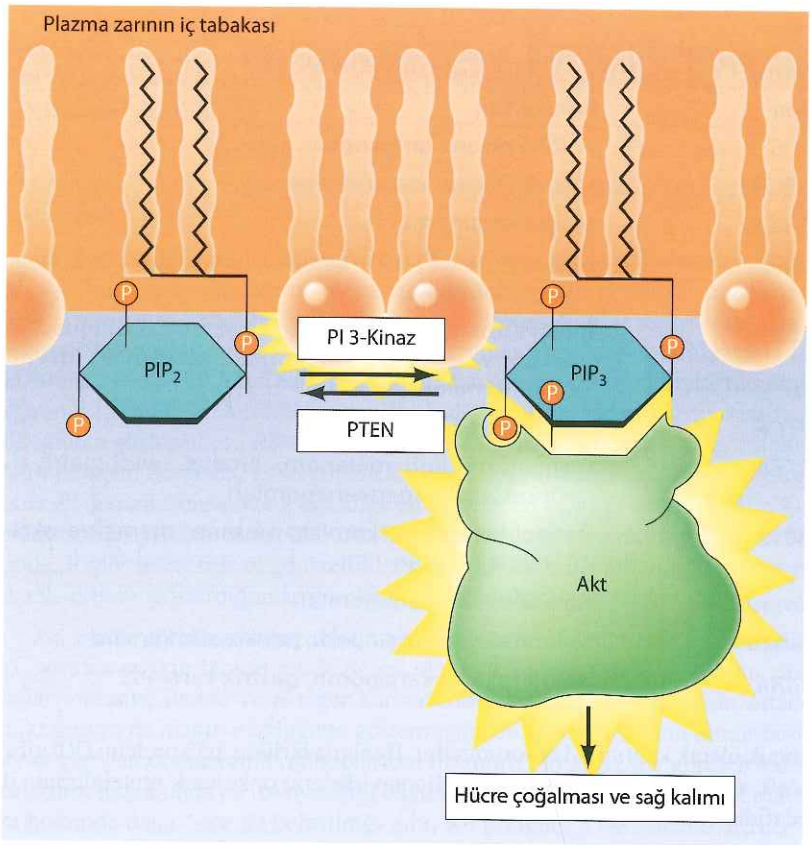
genetik olarak kalıtımından sorumludur. Bununla birlikte, p53 proteini (Rb gibi), SV40, adenovirüslerin ve insan popillomavirüslerin onkojenik proteinlerinin de hedefidir.

Akciğer ve prostat kanseri ile melanom gibi sık görülen birçok kanser türünde, *p53* 'ten başka *INK4* ve *PTEN* genlerinde de sıklıkla mutasyonlar gözlenir. Wnt (*APC)* ve *TGF-β* yolakları *(TβRII, Smad2* ve *Smad4* gibi) ile ilişkili diğer bazı tümör baskılayıcı genler ise, özellikle kolon tümörlerinde sıklıkla inaktifleştirilmiştir. *APC* genindeki kalıtsal mutasyonlar, sık görülen ve kalıtsal olmayan erişkin kolon kanserleri yanında, kolon kanserinin (Ailesel Adenomatöz Polipoz adı verilen) ender rastlanan, kalıtsal bir türünden de sorumludur. Bu mutasyonu taşıyan hastaların kolonlarında, yüzlerce benign adenom (polip) gelişir ve bunların bir bölümü zamanla malin nitelik kazanır. Diğer iki tümör baskılayıcı gende (*BRCA1* ve *BRCA2)* görülen kalıtsal mutasyonlar ise, toplam meme kanseri vakalarının %5 kadarını oluşturan kalıtsal meme kanserlerinden sorumludur. Wilms tümörü gibi ender görülen değişik kalıtsal kanser sendromlarının gelişiminden de, daha başka tümör baskılayıcı genlerde gerçekleşen mutasyonlar sorumludur. Bugün itibarı ile neredeyse 50'den fazla tümör baskılayıcı genin sık görülen kalıtsal kanser türleri ile ilişkisi bilinmektedir.

Tümör baskılayıcı gen ürünlerinin işlevleri

Proto-onkogen ve oıkogen proteinlerinin aksine, tümör baskılayıcı genlerin kodladığı proteinler, hücrenin çoğalmasını ve sağ kalımını baskılar. Bu yüzden tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, negatif düzenleyici olarak görev yapan bu proteinleri ortadan kaldırarak tümör gelişmesine neden olur. Tümör baskılayıcı proteinler, çoğunlukla onkogenler tarafından uyarılan aynı sinyal yollarını baskılar.

Tümör baskılayıcı ***PTEN*** geninin kodladığı protein, onkogen ve tümör baskılayıcı gen ürünleri arasındaki antagonizmin tipik bir örneğidir **(Şekil 19.34)**. PTEN proteini, fosfatidilinositol 3,4,5- bisfosfat (PIP_3) gibi, fosfatidilinositidlerin 3. pozisyonundaki fosfatı uzaklaştıran bir lipid fosfatazdır. PIP_3'ün

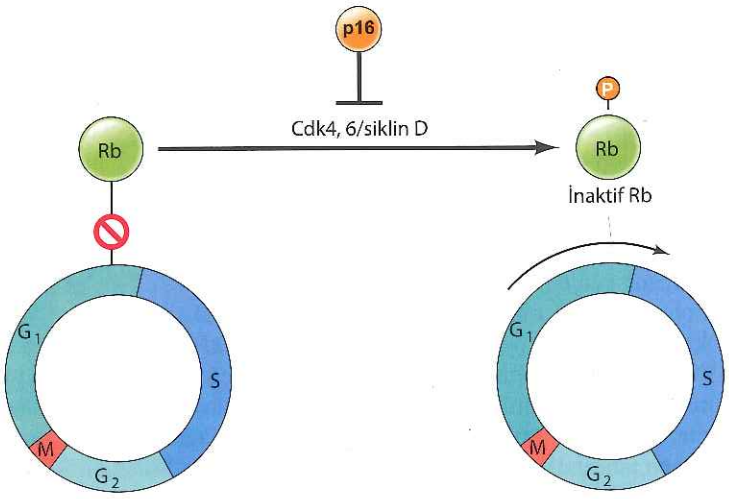


Şekil 19.34 Hücre çoğalması ve sağ kalımının PTEN tarafından baskılanması Tümör baskılayıcı protein olan PTEN, PIP_3'ün 3. pozisyonundaki fosfatı çıkartarak PIP_2'ye dönüştüren bir lipidfosfatazdır. Böylelikle, PTEN hücre çoğalmasını ve sağ kalımını uyaran PI 3-kinaz ve Akt onkogen proteinlerinin aktivitesine karşı koyar.

defosforilasyonu yoluyla PTEN, hücre sağ kalımını destekleyen ve onkogen olarak etki gösteren PI 3-kinaz ile Akt'ın etkilerini ortadan kaldırır. Bunun aksine, PTEN proteininin inaktivasyonu ya da ortadan kalkması da PIP_3 düzeyinin artmasına, Akt'ın aktivasyonuna ve programlı hücre ölümünün engellenmesine neden olarak tümör gelişmesini hızlandırır.

Gerek onkogenler, gerekse tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan proteinler, Hedgehog sinyal yolunda da görev yaparlar (bkz. Şekil 16.41). *Patched* (*PTCH*: Hedgehog reseptörünü kodlar) bazal hücreli karsinomlarda etkili olan bir tümör baskılayıcı gen iken, Smoothened (Patched tarafından inhibe edilir) bir onkogendir. Ayrıca, Smoothened tarafından aktifleştirilen Gli transkripsiyon faktörleri de, ilk olarak glioblastomlarda (malin bir beyin tümörü) amplifiye olan bir onkogen (*gli*) tarafından kodlanan proteinler olarak tanımlanmıştır.

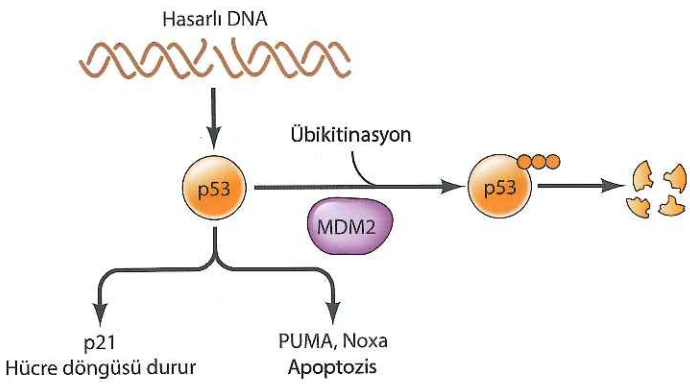
Bazı tümör baskılayıcı genler, transkripsiyonu düzenleyen proteinler kodlar. Bunların en iyi örneklerinden biri, TGF-β sinyali ile aktifleşen ve hücre çoğalmasını engelleyen transkripsiyon faktörlerini kodlayan *Smad2* ile *Smad4* tümör baskılayıcı genleridir (bkz. Şekil 16.39). Smad proteinleri tarafından uyarılan hedef genler arasında hücre çoğalmasını G_1 fazında durduran Cdk inhibitörleri p15, p21, p27 ve p57 de bulunur (bkz.Tablo 17.1). TGF-β sinyal yolunun hücre çoğalmasını engelleyen aktivitesi ile uyumlu olarak, TGF-β reseptörü de bir tümör baskılayıcı gen tarafından (*TβRII)* kodlanır.



Şekil 19.35 Hücre döngüsünün Rb ve p16 tarafından inhibisyonu Rb hücre döngüsünün ilerlemesini G_1 restriksiyon noktasından geçince durdurur. Cdk4,6/siklin D kompleksi Rb'yi fosfatlayarak ve inaktive ederek restriksiyon noktasından geçişi uyarır. Cdk4,6/siklin D aktivitesi p16 tarafından inhibe edilir. Rb ve p16 tümör baskılayıcı, buna karşın Cdk4 ve siklin D onkogendir.

Rb ve *INK4* tümör baskılayıcı genlerinin ürünleri, hücre döngüsünü ikisi de birer onkogen olan Cdk4 ve siklin D1 ile aynı noktada etkiler **(Şekil 19.35)**. Rb, hücre döngüsünün ilerlemesini ve DNA sentezinin gerçekleşmesini sağlayan genlerin transkripsiyonunu baskılayarak, hücre döngüsünü G_1 kontrol noktasında durdurur (bkz. Şekil 17.16). Normal hücrelerde kontrol noktasından geçiş, Rb'yi fosforilleyerek inaktive eden Cdk4,6/Siklin D kompleksi tarafından düzenlenir. Bu yüzden, *Rb*'nin mutasyon ile tümörlerde inaktifleşmesi, hücre döngüsü ilerlemesinin temel negatif düzenleyicilerini ortadan kaldırır. Cdk inhibitörü pl6'yı kodlayan *INK4* tümör baskılayıcı geni de, aynı kontrol noktasından geçişi düzenler. Bölüm 17'de anlatıldığı gibi, p16 proteini Cdk4,6/siklin D aktivitesini baskılar (bkz Tablo 17.1). Bu yüzden *INK4*'ün inaktivasyonu, Cdk4,6/siklin D kompleksinin aktivitesinde artışa yol açarak Rb'nin kontrolsüz fosforilasyonu ile sonuçlanır.

p53 geninin ürünü hem hücre döngüsünün ilerlemesini, hem de apoptozu düzenler DNA hasarı p53'ü hızla uyarır, p53 de hem proapoptotik, hem de hücre döngüsünü baskılayan genlerin transkripsiyonunu aktive eder **(Şekil 19.36)**. DNA hasarına yanıt olarak, p53 apoptozu başlatmanın yanısıra Cdk inhibitörü p21'i de uyararak hücre döngüsünün ilerlemesini engeller (bkz. Şekil 17.20). p21 proteini, Cdk2/siklinE kompleksini inhibe ederek hücre döngüsünün ilerlemesini G_1'de durdurur. Hücre döngüsünün durması, replikasyondan önce hasarlı DNA'nın onarımı için hücreye zaman kazandırır. p53'ün kaybı, hücre hasarına bağlı bu duraklamayı ortadan kaldırarak mutasyon sıklığının artmasına ve hücre genomunda kararsızlığa neden olur. Daha önce de bahsedildiği gibi, bu tür genetik kararsızlıklar, kanser hücre-



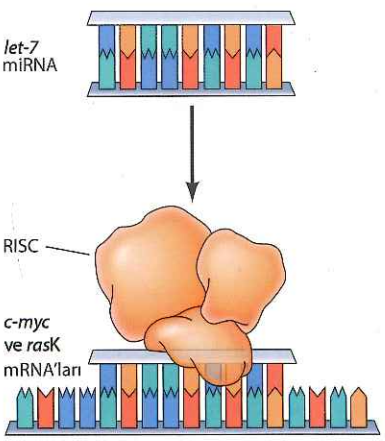
Şekil 19.36 p53'ün etkisi Normal p53, DNA hasarı oluştuğunda hem hücre döngüsünü durdurmak, hem de apoptozu başlatmak için gereklidir. Hücre döngüsünün durdurulmasına p21 inhibitörü olan Cdk'nın uyarılması aracılık ederken, apoptoza proapoptotik Bcl-2 ailesinin üyeleri olan PUMA ve Noxa aracılık etmektedir. MDM2 onkogen proteini, p53 degredasyonunu sağlayan bir übikütin ligazdır.

lerinin ortak özelliğidir. Bu özellik, tümör gelişimi sırasında onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde yeni değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olur.

Çok fazla DNA hasarı yüksek düzeyde p53 uyarımı ile sonuçlanabilir, bu da apoptoza neden olur. p53'ün apoptoz üzerindeki uyarıcı etkisi, kısmen, programlanmış hücre ölümünü uyaran Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyelerinin (PUMA ve Noxa) transkripsiyonunun aktivasyonu ile düzenlenir. Memeli hücrelerinde onarılamayan DNA hasarı normal olarak apoptozu başlatır. Bu olay potansiyel olarak zararlı mutasyon taşıyan hücreleri (örn. Kanser hücrelerine dönüşebilecek hücreler) ortadan kaldırdığından organizma için önemli avantajlar sağlayabilir. p53'den yoksun hücreler, radyasyon veya kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar gibi DNA hasarına yol açan ajanların etkisiyle apoptoza girmez. DNA hasarına rağmen apoptozun gerçekleşmemesi, tümörlerin kemoterapiye direnç göstermesine neden olur. Buna ek olarak, p53'ün kaybı büyüme faktörü eksikliği ya da oksijen yokluğu gibi başka uyaranlara bağlı olarak gerçekleşen apoptozu de engeller. p53'ün hücre sağ kalımı üzerindeki bu etkisi, insan kanserlerinde p53 mutasyonlarının çok sık gözlenmesini açıklamaktadır. *P53*'ün bir tümör baskılayıcı olarak merkezi rol oynaması ile uyumlu olarak, p53'ün degredasyonunu sağlayan bir onkogen tarafından kodlanan ve *MDM2* olarak adlandırılan bir übikütin ligazın ekspresyonundaki artış p53 düzeyini azaltarak hücre proliferasyonunu ve sağkalımını artırır. (bkz. Şekil 19.36)

Kalıtsal meme ve over kanserlerinin bir bölümünden sorumlu olan *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin kodladığı proteinler de hücre döngüsünün kontrol noktasında denetiminden ve DNA'daki çift iplik kırıklarının onarımından sorumludur. Bu açıdan *BRCA1* ve *BRCA2* genomun bütünlüğünü koruyan **kararlılık genleri** olarak görev yaparlar. Bu türden genlerde gerçekleşen mutasyonların kanser gelişimindeki rolü, hücre çoğalması ya da sağkalım üzerindeki doğrudan etkileri yüzünden değil, bu genin inaktivasyonu sonucunda onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde gerçekleşen mutasyonların sıklığının artması nedeniyledir. İşlev kaybı insan kanserleri ile ilişkilendirilen diğer kararlılık genleri arasında DNA hasarının kontrol noktasında görev yapan *ATM* geni (bkz. Şekil 17.19) ile bazı kalıtsal kolon kanserlerinden sorumlu olan hatalı eşleşme onarım genleri (bkz. Bölüm 7, Moleküler Tıp) ve Xeroderma pigmentosum'da mutasyonu görülen nükleotid kesip-çıkartma onarım genleri (bkz. Şekil 7.23) sayılabilir.

Daha önceki bölümlerde de anlatıldığı gibi, mikroRNA'lar (miRNA) ökaryot hücresinde gen ekspresyonunu düzenleyen başlıca elemanlardandır. miRNA'lar hayvan hücrelerinde transkripsiyon sonrasında etkili olup, mRNA'ları hedef alarak protein sentezini baskılar veya mRNA yıkımını hızlandırırlar (bkz. Şekil 9.20). miRNA'ların protein kodlayan genlerin yaklaşık yarısının düzenlenmesinde görev aldığı düşünülmektedir. Bu durum miRNA'ların kanser ile de ilişkili olabileceğini açıkça işaret etmektedir. Birçok tümörde miRNA ekspresyonunun normal dokuya kıyasla karakteristik değşiklikler göstermesi bu olasılığı desteklemektedir. Genel olarak, tümörlerde miRNA ekspresyonunun belirgin ölçüde daha düşük olması birçok miRNA'nın tümör baskılayıcı olarak etki gösterdiğine işaret eder. Bu türden bir miRNA olan *let-7 K-ras* ve *c-myc* onkogenlerini hedef alır **(Şekil 19.37)**. Tümör baskılayıcı olarak görev yapan bir başka miRNA da (*miR-34*) p53 tarafından uyarılır ve hücre döngüsünün ilerlemesini sağlayan (örn. Cdk4, cdk6, siklin E) ya da hücre sağkalımını destekleyen (örn. Bcl-2) çeşitli proteinleri kodlayan mRNA'ları hedef alır. Bununla birlikte, bütün miR-



Şekil 19.37 miRNA *let-7*'nin tümör baskılayıcı etkisi *let*-7 miRNA molekülü c-Myc ve K-ras onkogen proteinlerini kodlayan mRNA'ları hedef alır.

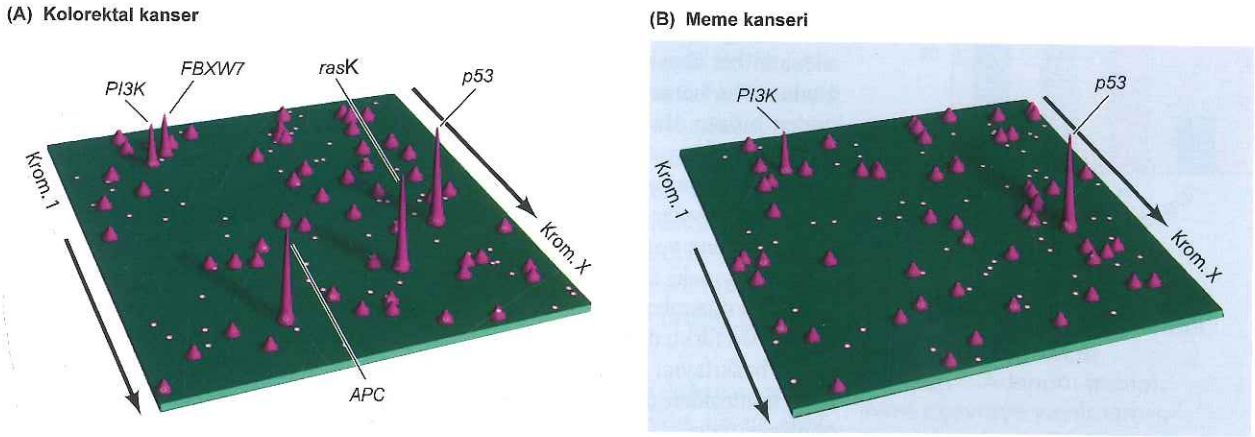
NA'lar tümür baskılayıcılar olarak çalışmazlar, bunun yerine, bazıları onkogen olarak etki edebilirler. Örneğin, birçok tümörde amplifikasyonu gözlenen ve *miR-17-92* adı verilen miRNA'lar hücre döngüsünü durduran (örn. Cdk inhibitörü p21) veya apoptozu uyaran (örn. Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyesi Bim) proteinleri kodlayan mRNA'ları hedef alır.

Kanser genom bilim (genomics)

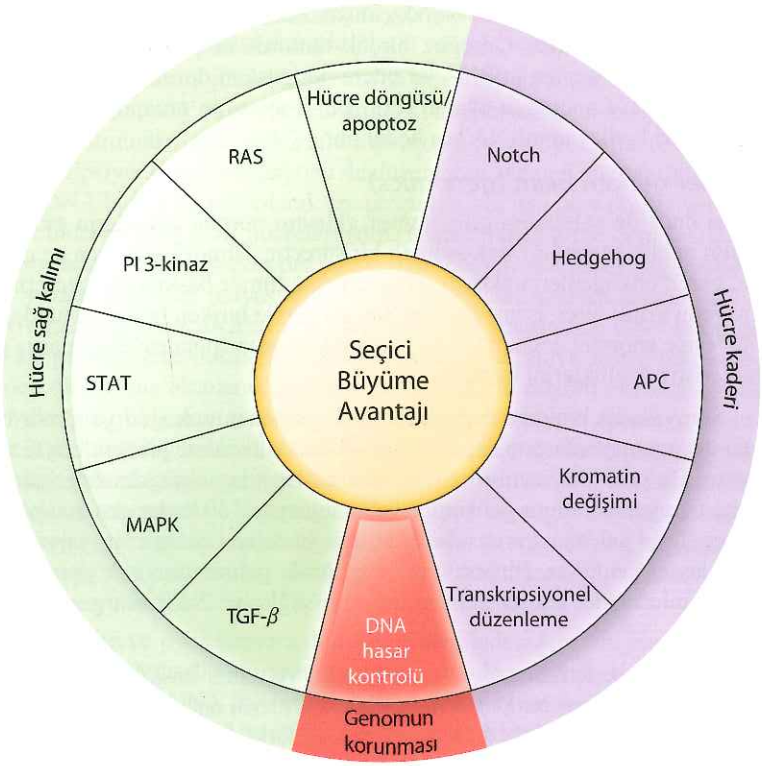
Daha önce de anlatıldığı gibi, kanser gelişimi normal hücrelerin giderek daha malin nitelik kazandığı, çok aşamalı bir süreçtir. Tümör başlangıcı ve gelişiminde, gerek onkogenlerin aktivasyonu, gerekse tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu kritik birer aşamadır. Çok sayıda gende biriken hasar, sonunda, kanser hücresine anormal çoğalma ve yayılma ile metastaz potansiyelinde artış gibi karakteristik özelliklerini kazandırır.

Son yıllarda binlerce değişik tümörde gözlenen onkogen ve tümör baskılayıcı gen mutasyonlarının dağılımı büyük ölçek dizileme yöntemleriyle araştırılmıştır. Bu geniş kapsamlı dizileme çalışmalarında, insan kanserlerinde mutasyona uğrayan ve tümör gelişimine katkı sağlayan 150 kadar gen tanımlanmıştır. Bu genlerin yaklaşık yarısı dominant etki gösteren onkogenler, yarısı da tümor baskılayıcı genlerdir. Birçok kanserde, tümör gelişiminin çok aşamalı niteliği ile uyumlu olarak kanser gelişimine katkı sağlayan 2-6 farklı gende mutasyon bulunur.

İnsan kanserlerinde çok sayıda onkogen ve tümör baskılayıcı gen tanımlandığı halde herhangi bir kanser türünde bu genlerin ancak birkaçında değişiklik saptanır. Örneğin, Şekil 19.38'de çok sayıda farklı kolon ve meme kanserlerinin dizi analizi sonuçları özetlenmiştir. Yüzden fazla kolon kanserinin analizinde, bireysel tümörlerin büyük bölümünde ortak olarak *K-ras* ve *PI3K* onkogenleri ile *APC* ve *p53* tümör baskılayıcı genler ve siklin E'nin degredasyonunu sağlayan bir übikütin ligazı kodlayan gen *(FBXW7)* gibi sadece belirli sayıda gende tutarlı olarak mutasyon görülmektedir **(Şekil 19.38A)**. Diğer genlerdeki mutasyonlara daha ender, genellikle tümörlerin %5'inden azında rastlanmaktadır. Meme kanserinde de benzer bir durum gözlenmekte, *p53* ile *PI3K* genlerinde mutasyona



Şekil 19.38 Kolorektal ve meme karsinomlarında genetik değişiklikler Kolorektal (A) ve meme (B) karsinomlarının gelişmesi ile ilişkilendirilen genlerdeki mutasyonların sıklığının ilgili genlerin kromozom üzerindeki yerlerine göre dağılımı, sol üst köşede 1. kromozomun kısa kolundan başlayarak ok yönünde gösterilmiştir. Grafiğin ön kenarını takip eden konumlar ikinci sırada arka kenardan başlayarak devam etmektedir. Kromozomlar uç uca düzenlenmiştir ve her pozisyondaki eğrinin yüksekliği ilgili genin mutasyon frekansını göstermektedir. (L. D. Wood et al. 2007, *Science* 318:1108'den alınmıştır.)



Şekil 19.39 İnsan onkogenleri ve tümör baskılayıcı genlerinin etkilediği yolaklar İnsan kanserlerinde mutasyona uğrayan onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, hücre sağkalımını, genomun korunmasını ve hücre kaderini düzenleyerek seçici çoğalma avantajı sağlayan 12 yolak halinde düzenlenebilir (B.Vogelstein et al. 203, *Science* 339:1546'dan alınmıştır).

sık rastlanmasına karşın başka genlerdeki mutasyonların daha az olduğu dikkat çekmektedir. **(Şekil 19.38B)**

Bireysel kanserler farklı genlerde mutasyonlar taşıyor olsalar da, farklı genlerde gözlenen bağımsız mutasyonlar sıklıkla aynı sinyal yolağını etkiler. Bu yüzden, birçok farklı onkogen ya da tümör baskılayıcı gende gerçekleşen değişik mutasyonlar hücre davranışlarını ve tümör gelişimini benzer biçimde etkileyebilir. Örneğin, bazı kolon kanserlerinde K-*ras* mutasyonları yerine *raf* onkogen ailesinin bir üyesini (B-*raf*) aktifleştiren mutasyonlar görülür. Raf sinyal yolağında ras'ın hemen aşağısında yer aldığından hem K-*ras*, hem de B-*raf* genlerinden birinin aktifleşmesi tümör hücrelerinde ERK sinyal yolunun uyarılmasıyla sonuçlanır. Aynı şekilde, bazı tümörlerde *PI3K* onkogeninde aktive edici mutasyonlar bulunurken, bazılarında *PTEN* tümör baskılayıcı geninde inaktive edici mutasyonlar bulunabilir. Bu mutasyonların her ikisi de Akt protein kinazın aktivasyonuna yol açarak hücre sağkalımını etkiler. Böylece, tümörlerde görülen çok sayıdaki farklı mutasyon hücre çoğalmasını, sağ kalımını ve genom kararlılığını düzenleyen daha az sayıdaki tamamlayıcı sinyal yolunu etkiler **(Şekil 19.39)**. Bu farklı düzenleyici sinyal yolaklarında yer alan çok sayıda onkogen ve tümör baskılayıcı gende biriken hasarların hücre çoğalmasının giderek daha da fazla kontrolden çıkmasından sorumlu olduğu ve kanser gelişmesine yol açtığı görülmektedir.

Kanser Tedavisinde Moleküler Yaklaşımlar

İnsan kanserlerinin gelişmesinden sorumlu moleküler nedenler konusunda bugünkü bilgimiz oldukça yeterlidir. Ancak, kanser bilimsel ilgi alanı olmanın ötesinde, her dört Amerikalı'dan birinin hayatını elinden alan korkutucu bir

hastalıktır. Bu yüzden, hem günümüzde, hem de gelecekteki araştırmaların başlıca hedefi, kansere ilişkin giderek artan bilgimizin bu hastalıktan korunma ve sağaltım konusunda pratik gelişmelere dönüşmesidir. Kanserin moleküler biyolojisini aydınlatmaya yönelik gelişmeler kanserden korunma ve tedavi konusunda yeni yaklaşımların ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır.

Korunma ve erken tanı

Kanserle mücadelenin en etkili yolu hastalığın ortaya çıkmasını önlemektir. İkinci ve etkili bir başka alternatif de, tümör gelişimini daha malin şekle dönüşmeden önce, kolayca tedavi edilebileceği aşamada saptamaktır. Vücuda yayılıp metastaz yapmadan önce saptandığında, kanserlerin birçoğu ameliyat ya da radyasyon gibi lokal tedavi girişimleri ile iyileştirilebilir. Örneğin, kolon kanseri malinite öncesi erken aşamalarda (adenomlar), genellikle küçük sayılabilecek cerrahi girişimlerle tamamen iyileşir **(Şekil 19.40)**. Oluştuğu bölgeden başka yere yayılmamış olan erken evre karsinomlarda da iyileşme oranı (%90) oldukça yüksektir. Buna karşılık kanser çevre dokulara ve lenf düğümlerine yayıldığında, sağ kalım oranı %70'lere, metastatik kolon kanserli hastalarda ise %13'e kadar düşer. Bu yüzden erken tanı, sağ kalım açısından çok önemli bir faktördür.

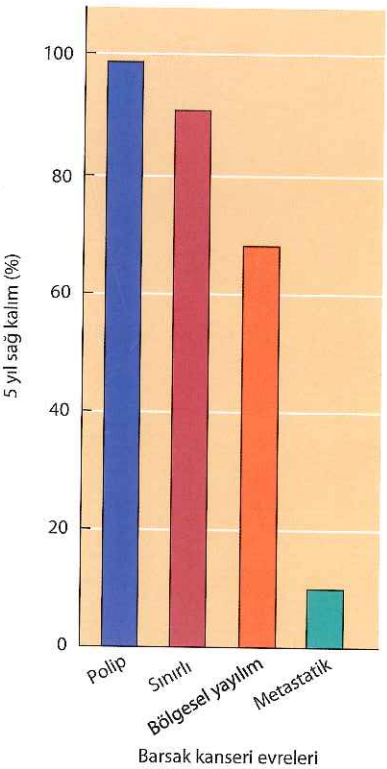
Moleküler biyolojinin, kanserin önlenmesi ve erken tanısı konusunda başlıca uygulama alanı, kalıtsal olarak kanser gelişmesine yatkınlık taşıyan bireylerin belirlenmesi olabilir. Bu gibi kalıtsal yatkınlık gösteren kanserler; tümör baskılayıcı genlerde, en az iki onkogende (*ret* ve *cdk4*), *BRCA1* ve *BRCA2* gibi kararlılık genlerinde ya da kalıtımsal polipsiz kolon kanserinin gelişmesine neden olan hatalı eşleşmelerin onarımdan sorumlu genlerde (bkz. Bölüm 7, Moleküler Tıp) gerçekleşen mutasyonlar sonucunda gelişebilir. Bu genlerdeki mutasyonlar genetik testlerle saptanabilir ve yüksek riskli bireyler hastalık ortaya çıkmadan önce belirlenebilir.

Kanser riski yüksek bazı hastalarda (örneğin *BRCA1 ve BRCA2* genindeki kalıtsal mutasyonu olan hastalar), kanserin gelişmesini önlemek için koruyucu cerrahi seçilebilir. Ek olarak, yüksek riskli bireylerin yakından izlenmesi bazı kanser tiplerinin erken saptanmasına ve daha iyi tedavi edilmesine de olanak verir. Örneğin, kolondaki adenomlar, kolonoskopi ile saptanarak malin şekle dönüşmeden önce çıkartılabilir. Ailesel adenomatöz polipozis'li (APC tümör baskılayıcı genindeki kalıtsal mutasyonlardan kaynaklanan) hastalarda, yaşamlarının ilk yirmi yılı içinde yüzlerce adenom gelişir. Bu yüzden, bu hastalarda poliplerden bazıları kaçınılmaz biçimde kansere dönüşmeden önce bütün kolon çıkartılır. Buna karşılık kalıtımsal polipsiz kolon kanserli hastalarda, daha az sayıda polip görülür ve bunlar daha ileri yaşlarda ortaya çıktığından rutin kolonoskopi ve kolon kanseri gelişimini engelleyen steroid olmayan anti-yangısal ilaçlar (NSAIDs: nonsteriodal anti-inflammatory drugs) gibi girişimler yararlı olabilir.

Bilinen genlerdeki bozuklukların neden olduğu kanserlerin doğrudan kalıtılması, kanser olgularının ancak %5'ini oluşturan ender bir olaydır. En sık görülen kalıtsal kanser sendromu, barsak kanserlerinin %15'ini ve ABD'de görülen tüm kanserlerin %1-2'sini oluşturan, kalıtsal polipsiz kolon kanseridir. *BRCA1* ve *BRCA2* tümör baskılayıcı genlerindeki mutasyonlar da, oldukça sık görülür ve tüm meme kanserlerinin yaklaşık %5'ini oluşturur. Diğer yandan, sık görülen erişkin kanserlerinin önemli bir bölümünün, kansere yatkınlığı daha düşük oranda arttıran başka genler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Buna benzer yeni kansere yatkınlık genlerinin tanımlanması klinik çıktıları olan önemli bir

Bilgi İçin

BRCA genlerinde kalıtsal mutasyonu olan kadınlar için koruyucu cerrahi, 2013 de Angelina Jolie'nin önleyici çift mastektomi olma kararı ile gündeme gelmiştir.



Şekil 19.40 Kolon karsinomlu hastalarda sağ kalım oranları Adenom (polip), henüz çevreye yayılmamış, sınırlı karsinom, komşu dokuya ve bölgesel lenf düğümlerine yayılmış karsinom ve uzak metastazları bulunan karsinom olguları sağ kalım oranları. (Data from American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures* 2015'ten alınmıştır.)

girişimdir. Kansere yatkınlık taşıyan bireylerin güvenilir biçimde belirlenmesi, eğer uygun erken tanı yöntemleri varsa, sonuçta kansere bağlı ölümleri önemli ölçüde etkileyebilir.

Tedavi

Günümüzde en önemli sorunlardan biri, onkogen ve tümör baskılayıcı genler konusundaki bilgilerin, kanser hücresini doğrudan hedef alan yeni ilaçların geliştirilmesine yardımcı olup olmayacağıdır. Kanser tedavisinde geleneksel olarak kullanılan ilaçların çoğu, ya DNA hasarına neden olan, ya da DNA'nın replikasyonunu engelleyen maddelerdir. Bu yüzden, söz konusu ilaçlar sadece kanser hücreleri için değil, normal hücreler ve özellikle kök hücrelerin hızlı bölünmesiyle yenilenen (hematopoyetik hücreler, mide-barsak sistemi epitel hücreleri ve saç follikül hücreleri gibi) hücreler için de toksiktir. Kanser ilaçlarının normal hücreler üzerindeki bu etkisi, ilaçlara bağlı toksisiteyi belirler ve bu ilaçların kanser tedavisinde etkin biçimde kullanımını kısıtlar.

Kanser tedavisinde bir başka yaklaşım da doğrudan kanser hücrelerini hedef almak yerine, anjiyogenezi (yeni damar oluşumunu) engelleyerek tümör büyümesini durduran ilaçların kullanılmasıdır. Bu bölümde daha önce de belirtildiği gibi, tümörün gelişmesi için gerekli olan oksijenin ve besin maddelerinin sağlanması yeni damarların oluşumuna bağlıdır. Bu yüzden anjiyogenez tümör gelişimi açısından kritik önem taşır. Tümör hücreleri, damar endotel hücreleri çoğalmaya uyararak tümörün içinde yeni kapilerler oluşmasını sağlayan çok sayıda büyüme faktörü salgılar (bkz. Şekil 18.15). Anjiyogenezin önemi, ilk olarak 1971 yılında Judah Folkman tarafından tanımlanmış, Folkman ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmalar, endotel hücrelerinin çoğalmasını durdurarak anjiyogenezi engelleyen yeni maddelerin geliştirilmesini sağlamıştır. Bu maddeler, özellikle, yeni damarların oluşumunu engellediğinden, normal hücreler için diğer antikanser ilaçlar kadar toksik değildir. Anjiyogenez inhibitörleri ile hem hayvan deneylerinde, hem de insan tümörlerindeki etkinliklerinin araştırıldığı klinik çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu olumlu klinik sonuçlar doğrultusunda 2004 yılında ABD'de kolon kanserinin tedavisi için VEGF molekülüne karşı geliştirilen bir monoklonal antikor olan ilk anjiogenez inhibitörü FDA (*Food and Drug Administration*) tarafından onaylanmıştır. Bu antikor günümüzde glioblastoma, böbrek kanseri ve akciğer kanserinde de kullanılmaktadır. Ayrıca, daha sonra böbrek kanseri tedavisinde kullanılmak üzere iki küçük VEGF reseptörü inhibitörü de (sunitinib ve sorafenib) onaylanmıştır.

Daha seçici kanser tedavisi yönünden en fazla ümit veren strateji tümör gelişimini hızlandıran onkogenleri doğrudan hedef alan maddelerdir. Ne yazık ki, kanser tedavisi açısından onkogenler sadece tümör hücresine özgü değildir. Protoonkogenler normal hücrelerde önemli işlevler üstlendiğinden, onkogenlerin ekspresyonunu ya da işlevini engelleyen maddeler tümör hücrelerini olduğu kadar normal hücreleri de etkiler. Bu yüzden onkogenlerin, antikanser maddelerin hedefi olarak değerlendirilmesi çok kolay değildir. Yine de, bu alandaki çok sayıda ümit verici gelişme, onkogenleri hedef alan seçici tedavilerin geliştirilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir **(Tablo 19.6).**

Belirli bir onkogene karşı ilk tedavi girişimi, akut promiyelositik lösemide uygulanmıştır. Bu lösemi türüne neden olan translokasyonda, retinoik asit reseptörünü *(RARα)* kodlayan gen bir başka gen ile *(PML)* birleşerek *PML/RARα* onkogenini oluşturur. PML/RARα proteininin transkripsiyonu baskılayarak hücre farklılaşmasını engellediği düşünülmektedir. Ancak, tedavi amacıyla yüksek doz retinoik asit verildiği takdirde, retinoik asit PML/RARα onkogen proteinine bağlanarak onun aktivitesini engellediğinden lösemili hücreler yeniden farklı-

Tablo 19.6 Onkogenleri Hedefleyen Tedavi Örnekleri

İlaç	Hedef protein	Tümör türü
Retinoik asit	PML/RARα	Akut promiyelositik lösemi
Herceptin	ErbB-2	Meme kanseri
Erbitux	ErbB	Kolorektal kanser
Imatinib	Abl	Kronik miyeloid lösemi
	Kit	Gastrointestinal stromal tümörler
	PDGFR	Gastrointestinal stromal tümörler, kronik miyelomonositer lösemi, Hipereozinofilik sendrom, Dermatofibrosarkoma protuberans
Gefitinib	ErbB	Akciğer kanseri
Erlotinib	ErbB	Akciğer kanseri
Vemurafenib	B-Raf	Melanom
Crizotinib	Alk	Akciğer kanseri
Vismodegib	SMO	Deri kanseri (bazal hücreli karsinom)
Trametinib	MEK	Melanom
Idelalisib	PI3K	Kronik lenfositik lösemi
Everolimus	mTOR	Renal hücreli karsinom, meme kanseri

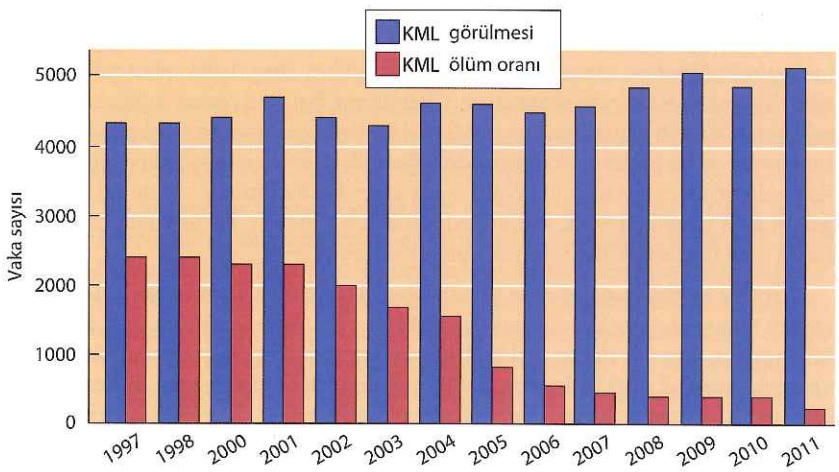
laşmaktadır. Retinoik asit tedavisi ile birçok hastada olumlu sonuç alınır, ancak bu etki genellikle devamlı olmaz ve sonunda hastalık yeniden nükseder. Buna karşılık, retinoik asit ile standart, kemoteropatik ilaçların birlikte kullanılması hastalığın nüksetme oranını önemli ölçüde azaltır. Bu yüzden akut promiyelösitik lösemi tedavisinde retinoik asit kullanımı belirgin yarar sağlar. Retinoik asidin tedavideki olumlu etkisi, *PML/RARα* onkogeninin bulunmasından önce saptanmış ve bu proteini eksprese eden lösemili hücrelere karşı etkisi ise, bilinçli ilaç geliştirme çalışmalarıyla değil, şans eseri keşfedilmiştir. Yine de, retinoik asidin akut promiyelösitik lösemi tedavisinde kullanımı, bir onkogen proteinini hedef alan ilaçların klinikteki yararına ilk örnektir.

ErbB-2 onkogen proteinine yönelik bir monoklonal antikor olan Herceptin, kanser tedavisinde belirli bir onkogene karşı geliştirilen ve klinik kullanım için FDA onayı alan ilk ilaçtır. ErbB-2 geninin amplifikasyonu sonucunda, meme kanserlerinin %25-30 kadarında, *erb*B-2 proteini aşırı eksprese olur. ErbB-2'nin (bir reseptör tirozin kinaz) aşırı ekspresyonu görülen hücrelerde, ErbB-2'nin hücre dışı bölgesini tanıyan bir antikorun, tümör hücrelerinin çoğalmasını durdurduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, Herceptin'in geliştirilmesini sağlamış, yapılan klinik çalışmalarda, tümörlerinde ErbB-2 aşırı ekspresyonu görülen metastatik meme kanserli 600'den fazla hastada, Herceptin'in tümör büyümesini önemli ölçüde yavaşlattığı ve hastaların ömrünü uzattığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda Herceptin, 1998 yılında yüksek ErbB-2 ekspresyonu gösteren metastatik meme kanserlerinin tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı almıştır. EGF reseptörüne (ErbB2 onkogeninin ürünü olan protein) karşı geliştirilen bir monoklonal antikor olan Erbitux da FDA tarafından önce 2004 yılında ileri evre

kolon kanseri, daha sonra da baş-boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır

Monoklonal antikorların kullanımı, büyüme faktörleri ve hücre yüzey reseptörleri gibi hücre dışındaki hedefler ile sınırlıdır. İlaç geliştirme açısından daha geniş bir uygulama alanı da, onkogen proteinlerini inhibe eden küçük moleküllerdir. Kanser hücrelerinin çoğalması ve sağ kalımını düzenleyen sinyal yollarında önemli rol oynayan protein kinazlar bu grupta yer alırlar. Bu alandaki ilk yenilik, kronik miyeloid lösemide Philadelphia kromozomuna özgü translokasyon sonucu ortaya çıkan (bkz. Şekil 19.22) Bcr/Abl tirozin kinaza karşı geliştirilen selektif inhibitördür. Brian Druker ve arkadaşları Bcr/Abl protein kinaza karşı güçlü ve spesifik bir inhibitör (imatinib ya da Gleevec) geliştirerek, bunun kronik miyeloid lösemi hücrelerinin çoğalmasını etkili biçimde durdurduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar üzerine, 1998 yılında imatinib'in etkisini araştıran bir klinik çalışma başlatılmış, imatinib ile çok az yan etkiye karşılık dikkate değer sonuçlar elde edilmiştir. Imatinib'in bu klinik çalışmalar ile saptanan çarpıcı başarısı, 2001 yılının Mayıs ayında ilacın FDA tarafından kronik miyeloid lösemi tedavisi için hızla onaylanmasını sağlamıştır. Bu tarihten sonra imatinib kullanımı sayesinde kronik miyeloid lösemiye bağlı ölümler %80 oranında azalmıştır (Şekil 19.41). Bazı hastalarda nüks ya da ilaca karşı direnç gelişmekle birlikte, imatinib bu lösemi türü için tartışmasız çok etkili bir tedavi olmuştur. İlginç olan nokta, imatinib direncinin Bcr/Abl proteininin kinaz bölgesinde gerçekleşen ve imatinibin bağlanmasını engelleyen mutasyonlardan kaynaklanmasıdır. Dirence neden olan bu mutasyonların incelenmesi sayesinde yeni inhibitörler de tanımlanması mümkündür. Bu yeni moleküllerin imatinibe karşı direnç gelişen lösemilerdeki etkinliği klinik çalışmalar ile araştırılmaktadır.

Imatinib aynı zamanda PDGF reseptörü ile Kit tirozin kinaz için de güçlü bir inhibitördür ve mutasyonla aktifleşerek onkogene dönüşen protein kinazların etkisiyle gelişen tümörlerde de başarıyla kullanılır. *Kit*, mide ve ince barsağın stromasındaki bağ dokusundan kaynaklanan stromal mide barsak tümörlerinin %90'ında nokta mutasyonları ile aktifleşen ve sürekli protein kinaz aktivitesi-



Şekil 19.41 Imatinib'in kronik miyeloid lösemiye bağlı ölümlere etkisi Amerika Birleşik Devletlerinde, 1997 – 2011 yılları arasındaki kronik miyeloid lösemi (KML) olgularının sayısı ve hastalığa bağlı ölüm oranları verilmiştir. Hastalığın sıklığı önemli bir değişiklik göstermediği halde 2001 yılında imatinib'in onaylanmasından sonra ölüm oranları %80 azalmıştır. (W. R. Sellers, 2011, *Cell* 147: 26'dan alınmıştır.)

Moleküler Tıp

Imatinib: *brc/abl* Onkogenini Hedef Alan Kanser Tedavisi

Hastalık

Kronik miyeloid lösemi (KML) erişkinlerde görülen lösemilerin yaklaşık %12'sini oluşturur. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2015 yılında yaklaşık 6700 yeni lösemi olgusunun görüleceği ve 1100 kişinin de bu hastalık nedeniyle hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir.

KML kemik iliğinin hematopoetik kök hücrelerinden gelişir. Yavaş ilerleyen bu hastalığın kronik faz ve blastik kriz olmak üzere iki klinik aşaması vardır. KML'nin kronik fazı çok az belirti gösterir ve yıllarca sürebilir. Ancak, sonunda bütün hastalar, blastik kriz adı verilen ve yaşamı tehdit eden akut faza girerler. Blastik krizinin tipik özelliği, blast adı verilen, hızla çoğalan çok fazla sayıda lösemi hücresinin birikmesidir. İmatinib geliştirilmeden önce blastik krizdeki hastalar, alışılmış kemoterapatik ilaçlar ile tedavi edilir, bu yolla hastalığın kronik faza geri dönmesi sağlanabilirdi. Kemoterapi, hastalığın kronik fazında da kullanılır ancak, genellikle lösemi hücrelerini ortadan kaldırmak için yeterli olmazdı. KML ayrıca kemik iliği kök hücrelerinin transplantasyonu ile de tedavi edilebilir. Kronik fazdaki hastaların yarısı bu işlem sonucunda tamamen iyileşir.

Moleküler ve Hücresel Temel

Kromozom 9 üzerindeki *abl* onkogeninin normal lokusundan 22. kromozoma translokasyonu sonucunda aktifleşmesi KML'lerin %95'inde görülen yaygın bir olaydır. Bu translokasyon, *abl* ile 22. kromozomdaki *bcr* genlerini birleştirerek *bcr/abl* füzyon onkogeninin oluşmasına neden olur. Onkogen tarafından sentezlenen Bcr/Abl füzyon proteininde Abl'nin birinci ekzonunun yerini Bcr'a özgü amino asit dizileri almıştır (bkz. Şekil 19.22). Bcr/Abl proteini, sürekli aktif durumda kalan bir tirozin kinazdır ve birçok değişik hücre içi sinyal yolağını aktifleştirerek lösemi gelişmesine neden olur.

KML'de *bcr/abl* onkogen aktivasyonunun çok yaygın olması, bu molekül, klinikte yararlı olabilecek selektif bir tirozin kinaz inhibitörü geliştirilmesi açısından uygun bir hedef olarak görülmüştür. Bu doğrultudaki çalışmalar, bir onkogen proteinine karşı selektif inhibitör olarak tasarlanan ilk başarılı ilaç olan imatinib'in (Gleevec olarak da anılır) geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır.

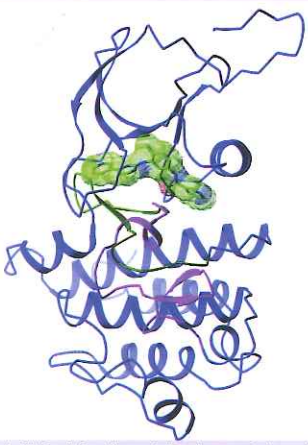
Koruma ve Tedavi

Imatinib'in geliştirilmesi, 2-fenilaminopirimidinin özgül olmayan bir protein kinaz inhibitörü olarak etki ettiğinin fark edilmesiyle başlamıştır. Daha sonra, Abl tirozin kinaz da dahil, farklı hedeflere karşı çok sayıda benzer madde sentezlenmiş ve bu maddelerin etkileri incelenmiştir. Bu araştırma kapsamında taranan çok sayıda bileşik arasında imatinib'in Abl'ye ve başka iki tirozin kinaza (PDGF reseptörü ve Kit) karşı güçlü ve spesifik inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur. Yapılan ileri araştırmalar, imatinibin hem *bcr/abl* onkogeni ile transforme edilen, hem de KML'li hastalardan izole edilen hücrelerin kültür ortamında çoğalmasını durdurduğunu göstermiştir. Imatinib ayrıca *bcr/abl* ile transforme edilen hücrelerin farede tümör oluşturmasını da engellemektedir. Buna karşın, normal hücreler veya başka onkogenler ile transforme edilen hücreler imatinibden etkilenmemiştir. Bu bulgular imatinibin Bcr/Abl tirozin kinaza karşı spesifikliğini göstermiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda imatinib için, 1998 yılının Haziran ayında başlatılan Faz I klinik çalışma çok başarılı sonuç vermiş, tedavi edilen kronik fazdaki 54 hastadan 53'ü tedaviye cevap verdiği gibi, ilaç verilen blast krizindeki hastaların yarısından çoğunda da imatinib tedavisine cevap alınmıştır. Bu ilk araştırmalardan elde edilen başarılı sonuçlar 1000 den fazla hastayı kapsayan Faz II çalışmanın başlatılmasına yol açmış, bu sefer kronik fazdaki hastaların %95'inde ve blast krizindeki hastaların yaklaşık %50'sinde elde edilen umut verici sonuçlar, ilk bulguları doğrulamıştır. Üstelik, diğer alışılmış kemoterapötik ilaçlara kıyasla imatinibin yan etkisi son derece azdır. Bu klinik araştırmalar imatinibin KML tedavisinde son derece etkili bir tedavi olduğunu göstermiş ve ilacın Mayıs 2001'de FDA tarafında hızlandırılmış onay almasıyla sonuçlanmıştır. Bu olay temel araştırmaların klinik uygulamaya girmesi açısından bir dönüm noktasıdır. 2001 yılında onay almasından sonra imatinib kullanımı sayesinde KML nedeniyle ölümler % 80 oranında azalmıştır.

Referans:

Druker, B. J. 2002. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for KML. *Oncogene* 21: 8541- 8546



Imatinibin bir türevi ile kompleks oluşturan Abl'nin katalitik bölgesinin kristal yapısı. (T. Schindler, W. Bommann, P. Pellicena, W. T. Miller, B. Clarkson and J. Kuriyan. 2000. *Science* 289: 1938.)

ne neden olan bir onkogendir. *Kit* geninde aktifleştirici mutasyon bulunmayan stromal mide barsak tümörlerinde ise PDGF reseptörünü aktifleştiren mutasyonlar görülür. Bu nedenle stromal mide barsak tümörleri imatinib tedavisine cevap verir. Imatinib ayrıca, PDGF reseptörünün Tel transkripsiyon faktörü ile birleşmesiyle ortaya çıkan (bkz. Şekil 19.24) kronik monomiyelositik lösemi

dahil, PDGF reseptörünün onkogen olarak aktifleştiği üç başka tümör tipinde de etkilidir.

EGF reseptörünün inhibitörü olarak etki eden iki küçük molekül de (gefitinib ve erlotinib) akciğer kanserinin, EGF reseptörünün nokta mutasyonları ile aktifleştiği bir alt grubunda, şaşırtıcı ölçüde etkilidir. Akciğer kanserlerinde bu inhibitörler ile tedavinin temel prensibi, bu kanserlerin çoğunda EGF reseptörlerinin mutasyonla onkogene dönüşmesi değil, aşırı eksprese olmasıdır. Imatinib'in kronik miyeloid lösemideki genel etkinliğinin aksine, klinik çalışmalarda gefitinib ile erlotinib'in akciğer kanserli hastaların sadece %10'unda etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak, ilacın etkili olduğu bu grup içindeki hastalarda elde edilen sonuçlar çok başarılıdır. 2004 yılında iki farklı araştırmada inhibitör tedavisine cevap veren kanserlerde EGF reseptörünün sürekli aktif durumda kalmasına neden olan mutasyonlar bulunduğunun gösterilmesi bu konuda önemli gelişme sağlamıştır . Bu sonuçlar EGF reseptörü inhibisyonunun normal proteini eksprese eden tümörler için değil, reseptörün mutasyonla onkogene dönüştüğü tümörlerde etkili bir tedavi olduğunu göstermiştir. Yakın dönemde, bir başka protein kinaz (Alk) inhibitörünün de akciğer kanserinde Alk geninin translokasyon sonucu onkogene dönüştüğü farklı bir akciğer kanser alt grubunda etkili olduğu bulunmuştur. Met ve Ret tirozin kinazları kodlayan onkogenlerin aktive olduğu durumlarda, diğer tirozin kinaz inhibitörleri tümörlere karşı etkilidir.

Bir B-Raf inhibitörü (Vemurafenib) ile de melanoma tedavisinde çarpıcı sonuçlar elde edilmiştir. Insan melanomlarının %60'ında görülen *B-Raf* geni, kodladığı proteinin 600. pozisyonundaki Valin amino asitinin Glutamik asite dönüşmesine neden olan bir mutasyon sonucunda onkogen olarak aktifleşir. Vemurafenib, proteinin 600. pozisyonunda Glutamik asit bulunan B-Raf proteinine daha yüksek afinite ile bağlandığından mutant B-Raf onkogen proteinini seçici olarak inhibe eder ve bu mutasyonu taşıyan melanomalara karşı çok etkilidir. Vemurafenib 2011 yılında ileri melanoma olgularında kullanılmak üzere FDA onayı almıştır. Kanser tedavisi için onay alan diğer onkogen-hedefleyen ilaçlar ise MEK, PI 3-kinaz ve mTOR inhibitörleridir (bkz Şekil 16.32). Bunun yanısıra Hedgehog sinyal yolağının bir inhibitörü de Hedgehog reseptörü Smoothened molekülünde onkogenik mutasyon bulunan bazal hücreli kanserlerin tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır (bkz. Şekil 16.41).

Onkogen inhibitörlerinin kanser tedavisindeki etkinliği, onkogen aktifleşmesi sonucunda ortaya çıkan tümörlerin, bu onkogenlerin inhibitörlerine karşı özellikle duyarlı oldukları hipotezini desteklemektedir. Bu hipotez, hayvan model sistemleri kullanılarak gerçekleştirilen birçok deneyle de uyumludur. Tümörlerin, aktifleşen onkogenlerin inhibisyonuna karşı sergiledikleri duyarlık **"onkogen bağımlılığı"** olarak adlandırılmaktadır. Bu durumda, , tümör hücresinde çoğalmayı sürdüren başlıca itici gücün aktifleşen onkogen olduğu, hücredeki diğer sinyal yolaklarının öneminin ikinci planda kaldığı düşünülmektedir. Sonuç olarak, normal hücrelerde herhangi bir sinyal yolağı bloklandığında diğer sinyal yolakları onun işlevini üstlenirken, tümör hücresinin çoğalması ve sağ kalımı onkogenin aktivitesinin devamlılığına bağımlı hale gelebilmektedir. Bu yüzden bir aktif onkogen taşıyan bir kanser hücresi bu onkogen tarafından kodlanan proteinin inhibisyonuna seçici olarak duyarlı olabilir.

Onkogenleri hedef alan tedavilere tümörlerin yanıtları başlangıçta çok iyi olsa da, bu ilaçların etkinliği direnç gelişimi nedeniyle sınırlıdır. Bununla birlikte imatinib tedavisi kronik miyeloid löseminin uzun süreli tedavisi için etkilidir **(Şekil 19.41)**. Akciğer kanserli veya melanomlu çoğu hasta EGF reseptörü veya B-Raf inhibitörlerine, direnç gelişmeden önce, yaklaşık bir yıl süre ile yanıt verir. Direnç, hedeflenen tirozin kinazda mutasyon gelişimi, diğer tirozin kinazların aktivasyonu ve aşağı yöndeki onkogenik yolakların aktivasyonu gibi

birçok mekanizma ile gelişebilir. Örneğin, Ras veya PI 3-kinaz'ın onkogenik aktivasyonu EGF reseptör inhibitörlerine direnç ile sonuçlanabilir. Bu nedenle, ilaç direncini çoklu hedeflenmiş tedaviler ile önleme girişimleri sürmekte olan araştırmaların ana odak noktasıdır.

Yapılması gereken çok şey olsa da, yukarıda anlatılan ilaç etkinlikleri onkogenlerin kanser hücrelerine karşı seçici etkili, yeni nesil ilaç geliştirme hedefleri olarak kullanılmaya devam edileceğini göstermektedir. Kanser hücrelerinin mutasyonla aktifleşen onkogenlere bağımlılığının olası bir başka sonucu da, onkogenleri hedef alan ilaçlar ile tümör genomlarının dizilenmesinden elde edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde kanser tedavisinde önemli ilerlemeler sağlanacağı konusunda umut vermesidir. Moleküler biyolojinin kanser tedavisine nihai katkısı henüz görülmemiş olsa da, belirli onkogen proteinlerini hedef alan rasyonel ilaç tasarımlarının bu konuda önemli rol oynayacağı kesindir.

ÖZET

Kanserin Gelişimi ve Nedenleri

- ***Kanser türleri:*** Kanser herhangi bir hücrenin anormal çoğalması sonucunda ortaya çıkabilir. Hasta için en önemli olan konu, oluştukları bölgede sınırlı kalan benign tümörler ile normal dokulara ve bütün vücuda yayılan malin tümörlerin ayırımıdır. Bkz **Animasyon 19.1** ve **Video 19.1**
- ***Kanserin gelişimi:*** Tümörler, bir değişiklik nedeniyle anormal çoğalmaya başlayan bir tek hücreden gelişir. Gerçekleşen yeni mutasyonlar giderek, daha hızlı çoğalma, invazyon, sağ kalım ve metastaz yeteneğine sahip hücrelerin ortaya çıkmasına olanak verir. Bkz **Video 19.2**
- ***Kanserin nedenleri:*** Radyasyon ve birçok kimyasal karsinojen DNA hasarı yaratarak, mutasyonlara neden olurlar. Bazı başka karsinojenler ise hücre çoğalmasını uyararak, kanser gelişimine katkıda bulunur. Virüsler de insan ve başka canlılarda kansere neden olabilir.
- ***Kanser hücresinin özellikleri:*** Kanser hücresinin denetimsiz çoğalması ekstraselüler büyüme faktörlerine gereksinimin azalması ve kontakt inhibisyonun kaybı gibi özelliklerine yansır. Birçok kanser hücresi, *in vivo* koşullarda sürekli çoğalmalarıyla uyumlu olarak, farklılaşma açısından da kusurludur. Kanser hücrelerinin apoptoza girmeme konusundaki karakteristik özelliği tümör gelişimine önemli katkıda bulunur. Bkz **Animasyon 19.2**
- ***Hücrelerin kültürde transformasyonu:*** Hücre transformasyonunu gösteren *in vitro* testlerin geliştirilmesi, kültür ortamında normal hücrelerin tümör hücresine dönüşmesini izleme olanağı vermiştir.

Tümör Virüsleri

- ***Hepatit B ve C virüsleri:*** Hepatit B ve C virüsleri insanda karaciğer kanserine neden olur.
- ***Küçük DNA virüsleri:*** Papillomavirüsler insanda serviks kanseri başta olmak üzere birçok tümöre neden olurlar. Merkel hücre polyoma virüsü de ender görülen bir cilt tümörüne neden olur. Diğer küçük DNA tümör virüsleri insanda kanser yapmadıkları halde, bu vürüsler hücre transformasyonunun moleküler biyolojisini incelemek için önemli model sistemler oluştururlar. Bu virüslerin transformasyona yol açan proteinleri sıklıkla hücrede tümör baskılayıcı Rb ve p53 proteinleri ile etkileşirler.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

kanser, tümör, benign tümör, malin tümör, metastaz, karsinom, sarkom, lösemi, lenfoma

tümör başlangıcı, tümörün ilerlemesi, adenom, polip

karsinojen, tümör kamçılayıcı

yoğunluğa-bağlı inhibisyon, kontakt inhibisyon, otokrin çoğalma uyarımı, anjiyogenez, programlı hücre ölümü, apoptoz

hücre transformasyonu

tümör virüsü, hepatit B virüsü, hepatit C virüsü

polyomavirus, papillomavirüs adenovirüs, Merkel hücre polyoma virüsü

ÖZET

- ***Herpesvirüsler:*** En karmaşık hayvan viruslarından olan herpesviruslar insan dahil birçok canlıda kanser yapabilir.
- ***Retrovirüsler:*** Retroviruslar de insanda ve başka canlılarda kansere neden olabilir. Bazı retroviruslar hücre transformasyonuna yol açan belirli genlere sahiptir. Yüksek düzeyde onkogenik olan bu retrovirusların araştırılması viral ve hücresel onkogenlerin tanımlanmasını sağlamıştır.

Onkogenler

- ***Retroviral onkogenler:*** Tanımlanan ilk onkogen, RSV'nun *src* genidir. Daha sonraki araştırmalarda farklı retroviruslara ait iki düzineden fazla değişik onkogen tanımlanmıştır.
- ***Proto-onkogenler:*** Retroviral onkogenler kendilerine çok benzeyen, proto-onkogen adı verilen, normal hücre genlerinden türemiştir.
- ***İnsan kanserlerinde onkogenler:*** Onkogenlerin birçoğu, nokta mutasyonu, DNA yeniden düzenlenmeleri ve gen amplifikasyonu yoluyla aktifleşirler. Bunların bazıları, örneğin, *ras* genleri ilk kez retroviruslarda tanımlanan onkogenlerin hücresel eşleniğidir.
- ***Onkogen ürünlerinin işlevleri:*** Onkogen proteinlerinin çoğu hücre çoğalmasını uyaran sinyal yollarında görev yaparlar. Siklin D1 ile Cdk4 'ü kodlayan genler de hücre çoğalmasını uyararak onkogen olarak işlev gösterebilirler. Bazı onkogen proteinleri hücrenin farklılaşmasını engellerken PI 3-kinaz, Akt ve Bcl-2'yi kodlayan onkogenler apoptozu baskılar.

Tümör Baskılayıcı Genler

- ***Tümör baskılayıcı genlerin tanımlanması:*** Onkogenlerin aksine, tümör baskılayıcı genler, tümörün gelişmesini durdurur. Bu genlerin tipik örneği olan *Rb* geni, retinoblastom kalıtımını inceleyen çalışmalarla saptanmıştır. *Rb*'nin veya *p53* gibi başka bir tümör baskılayıcı genin kaybı ya da mutasyonla işlevini kaybetmesi birçok insan kanserinin gelişmesini hızlandırabilir. Bkz Video 19.2
- ***Tümör baskılayıcı gen ürünlerinin işlevleri:*** Çoğu tümör baskılayıcı gen tarafından kodlanan proteinler hücre proliferasyonu ve sağkalımında inhibitör olarak rol oynar. Rb, INK4 ve p53 proteinleri hücre döngüsü ilerlemesinin inhibitörleridir. Ek olarak, p53 DNA hasarı veya diğer uyaranlar ile indüklenen apoptoz için gereklidir, bu yüzden p53 inaktivasyonu tümör hücrelerinin sağ kalımını artırır. *BRCA1* ve *BRCA2* gibi bazı genler hücre proliferasyonunu doğrudan etkilemekten çok genomik kararlılığın sürmesini sağlar
- ***Kanser genom bilim (genomics):*** İnsan kanserleri gerek onkogenlerde, gerekse tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar nedeniyle gelişebilir. Bu türden çok sayıda gende biriken hasar, hücrenin çoğalması, farklılaşması ve sağ kalımı açısından kanser hücresine özgü değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olur. Tümör gelişimine katkıda bulunan çok sayıda farklı gen, göreceli olarak daha az sayıdaki hücre düzenleyici yolağın aktivitesini etkiler.

Kanser Tedavisinde Moleküler Yaklaşımlar

- ***Korunma ve erken tanı:*** Kanserlerin çoğu, tümör gelişiminin erken aşamalarında saptandığı takdirde, tedavi edilebilir. Genetik testlerle, kansere yatkınlık gösteren bireylerin belirlenmesi, erken tanı şansı verdiği gibi riskli hastaların daha etkili biçimde tedavi edilmesine de olanak sağlayabilir.
- ***Tedavi:*** Belirli onkogenlere karşı hedeflenmiş ilaçların geliştirilmesi, kanser hücrelerine karşı seçici etki gösteren yeni terapotik ajanların keşfi için başlangıçtır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

Herpesvirüs, Kaposi sarkomu ile ilişkili herpesvirüs Epstein-Barr virüsü

retrovirüs: Rous sarkoma virüsü

Onkogen, *src, ras, raf*

Proto-onkogen

***c-myc, abl, erb*B2**

Fos, jun, CCND1, erbA,

PML/RARα, PI 3-Kinaz, Akt, bcl-2

Tümör baskılayıcı gen, *Rb, p53*

PTEN, kararlılık geni

Onkogen bağımlılığı

Sorular

1. Benign tümör ile malin tümör arasında ne fark vardır?
2. Kanser gelişiminde klonal seçimin rolü nedir?
3. Östrojenler kanser riskini neden arttırır?
4. Otokrin büyüme faktörü uyarısı tümörün gelişimine nasıl katkıda bulunur?
5. Kanser hücrelerinin hangi özellikleri bu hücrelere metastaz yeteneği kazandırır?
6. AIDS'li hastalarda belirli kanser türleri neden daha sık görülür?
7. Bir proto-onkogen protein kodlayan bölgesinde değişiklik ya da mutasyon olmadan onkogene nasıl dönüşür? Bunu sağlayan iki değişik yol belirtiniz.
8. İnaktif Rb proteinini eksprese eden hücrelerde *INK4* tümör baskılayıcı gen ürününün aşırı ekspresyonunun etkisi ne olur?
9. Radyasyon tedavisine karşı *p53* geni normal olan tümörlerin mi, yoksa mutant *p53* taşıyan tümörlerin mi daha duyarlı olmasını beklersiniz?
10. Imatinib'in etki mekanizması nedir? Bazı tümörlerde bu ilaca karşı direnç nasıl gelişir?
11. Onkogen bağımlılığı nedir ? Bu kavram kanser tedavisinde moleküler hedeflerin seçilmesi açısından neden önem taşır?
12. Raf genini aktifleştiren bir mutasyon MEK protein kinaz inhibitörüne karşı direnç neden olur mu?

Atıf

Hücre

Eşlik Eden Web Sitesi
sites.sinauer.com/cooper7e
sınavlar, animasyonlar, videolar, bilgi kartları ve diğer çalışma kaynakları için.

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

(Her ana bölüm için en önemli derlemeler **kalın** olarak vurgulanmıştır.)

Kanserin Gelişimi ve Nedenleri

Adams, J. M. and A. Strasser. 2008. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res.* 68: 4018-4021. [R]

Colditz, G. A., T. A Sellers and E. Trapido.2006. Epidemiology-Identifying the causes and preventability of cancer? *Nature Rev. Cancer* 6: 75-83. [R]

Elinav, E., R. Nowarski, C. A Thaiss, B. Hu, C. Jin and R. A Flavell. 2013. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nature Rev. Cancer*. 13: 759-771. [R]

Hanahan, D. and R. A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674. [R]

Kuilman, T., C. Michaloglou, W. J. Mooi and D. S. Peeper. 2010. The essence of senescence *Genes Dev.* 24: 2463-2479. [R]

Nowell, P. C. 1986. Mechanisms of tumor progression. Cancer Res. 46: 2203-2207. [R]

Peto, J. 2001. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411: 390-395. [R]

Raff, M. C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400. [R]

Rosen, J. M. and C. T. Jordan. 2009. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324: 1670-1673. [R]

Tenen, D. G. 2003. Disruption of differentiation in human cancer : AML shows the way. *Nature Rev. Cancer* 3: 89-101. [R]

Vanharanta, S. and J. Massague. 2013. Origins of metastatic traits. *Cancer Cell* 24: 410-421. [R]

Wan, L., K. Pantel and Y. Kang. 2013. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nature Med.* 19: 1450-1464. [R]

Tümör Virüsleri

Boshoff, C. and R. Weiss. 2002. AIDS-related malignancies. *Nature Rev. Cancer* 2: 373-382. [R]

Bouchard, M J. and R. J. Schneider. 2004. The enigmatic X gene of hepatitis B virus *J. Virol.* 78: 12725-12734. [R]

Coffin, J. M., S. H. Hughes and H. E. Varmus, eds. 1997. *Retroviruses*. Woodbury, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Damania, B. 2004. Oncogenic γ-herpesviruses: Comparison of viral proteins involved in tumorigenesis. *Nature Rev. Microbiol.* 2: 656-668. [R]

Ganem, D. 2006. KSHV infection and the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1: 273-296. [R]

Grassmann, R., M. Aboud and K.-T. Jeang. 2005. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* 24:5976-5985. [R]

Helt, A.-M and D. A. Galloway. 2003. Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* 24: 159-169. [R]

Matsuoka, M. and K.-T. Jeang. 2007. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature Rev. Cancer* 7: 270-280.[R]

Mesri, E. A., E. Cesarman and C. Boshoff. 2010. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nature Rev. Cancer* 10: 707-719. [R]

Moody, C. A. and L. A. Lairnins 2010. Human papilloma virus oncoproteins: pathways to

transformation. *Nature Rev. Cancer* 10: 550-560. [R]

Moore, P. S. and Y. Chang. 2010. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virol ogy. Nature Rev. Cancer 10: 878-889. [R]

Polk, D. B. and R. M. Peek Jr. 2010. *Helicobacter pylori:* gastric cancer and beyond *Nature Rev. Cancer* 10: 403-414. [R]

Saenz-Robles, M. T., C. S. Sullivan and J. M. Pipas. 2001. Transforming functions of simian virus 40. *Oncogene* 20: 7899-7907. [R]

Young, L. S. and A. B. Rickinson. 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Rev. Cancer.* 4: 757-768. [R]

zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Rev. Cancer* 2: 342-350. [R]

Onkogenler

Albertson, D. G. 2006. Gene amplification in cancer. *Trends Genet.* 22: 447-455. [R]

Blume-Jensen, P. and T. Hunter. 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411: 355-365. [R]

Clevers, H. 2006. Wnt/β-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127: 469-479. [R]

Dang, C. V. 2012. *MYC* on the path to cancer. *Cell* 149: 22-35. [R]

Danial, N K. and S. J Korsmeyer 2004. Cell death: Critical control points. *Cell* 116 : 205-219 [R]

Der, C. J., T. G. Krontiris and G. M. Cooper. 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 79: 3637-3640. [P]

Dorsam, R. T. and J. S. Gutkind. 2007. Gprotein-coupled receptors and cancer. *Nature Rev. Cancer* 7:79-94. [R]

Downward, J. 2006. Prelude to an anniversary for the RAS oncogene. *Science* 314: 433-434. [R]

Krontiris, T. G. and G. M. Cooper. 1981. Transforming activity of human tumor DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 78: 1181-1184. [P]

Leder, P., J. Battey, G. Lenoir, C. Moulding, W. Murphy, H. Potter, T. Stewart and R. Taub. 1983. Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* 222: 765-771. [R]

Martin, G. S. 1970. Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 227: 1021-1023. [P]

Mitelman, F., B. Johansson and F. Mertens. 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Rev. Cancer* 7: 233-245. [R]

Nussenzweig, A. and M. C. Nussenzweig. 2010. Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. *Cell* 141: 27-38. [R]

Pylayeva-Gupta, Y., E. Grabocka and D. BarSagi. 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Rev. Cancer* 11: 761-774. [R]

Shih, C., L. C. Padhy, M. Murray and R. A. Weinberg. 1981. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 300: 539-542. [P]

Stehelin, D., H. E. Varmus, J. M. Bishop and P. K. Vogt. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260: 170-173. [P]

Stephen, A. G., D. Esposito, R. K. Bagni and F. McCormick. 2014. Dragging Ras back in the ring. *Cancer Cell* 25: 272-281. [R]

Tabin, C. J., S. M. Bradley, C. I. Bargmann, R. A. Weinberg, A. G. Papageorge, E. M. Scolnick, R. Dhar, D. R. Lowy and E. H. Chang. 1982. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300: 143-149. [P]

Thorpe, L. M., H. Yuzugullu and J. J. Zhao. 2015. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature Rev. Cancer* 15: 7-24. [R]

Vanhasesebroeck, B., L. Stephens and P. Hawkins. 2012. PI3K signaling: the path to discovery and understanding. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 195203. [R]

Vogelstein, B. and K. W. Kinzler. 2004 Cancer genes and the pathways they controL *Nature Med.* 10: 789-799. [R]

Vogt, P. K. 1971. Spontaneous segregation of nontransforming viruses from cloned sarcoma viruses. *Virology* 46: 939-946. [P]

Vogt, P. K. 2012.Retroviral oncogenes : a historical primer. *Nature Rev. Cancer* 12: 639-648. [R]

Tümör Baskılayıcı Genler

Adams, B. D., A. L. Kasinski and F. J. Slack. 2014. Aberrant regulation and function of rnicroRNAs in cancer. *Curr. Biol.* 24: R762-R776. [R]

Chan, E., D. E Prado and J. B. Weidhaas. 2011. Cancer microRNAs: from subtype profiling to predictors of response to therapy. *Trends Mol. Med.* 17:235-243. [R]

Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert and T. P. Dryja. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323: 643-646. [P]

Hammond, S. M. 2007. MicroRNAs as tumor suppressors. *Nature Genet.* 39: 582-583. [R]

Harris, H., O. J. Miller, G. Klein, P. Worst and T. Tachibana 1969. Suppression of malignancy by cell fusion. Nature 223: 363-368. [P]

Kastan, M. B. and J. Bartek. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316-323. [R]

Knudson, A. G. 1976. Mutation and cancer: A statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 68: 820-823. [P]

Lee, W.-H., R. Bookstein, F. Hong, L.-J. Young, J.-Y. Shew and E. Y.-H. P. Lee. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification, and sequence. *Science* 235: 1394-1399. [P]

Levine, A. J. and M. Oren. 2009. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Rev. Cancer* 9: 749-758. [R]

Manning, A. L. and N J Dyson. 2011. pRB, a tumor suppressor with a stabilizing presence. *Trends Cell Biol.* 21: 433-441. [R]

Muller, P. A. J. and K. H. Vousden 2014 Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 25: 304-317. [R]

Narod, S. A. and W. D. Foulkes. 2004. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Rev. Cancer* 4: 665-676. [R]

Negrini, S., V. S. Gorgoulis and T. D. Halazonetis. 2010 Genomic instability-an evolving hallmark of cancer. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 220-228. [R]

Pardali, K. and A. Moustakas. 2007. Actions of TGF-β as a tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim. Biophys Acta* 1775: 21-62. [R]

Sherr, C. J. 2004. Principles of tumor suppression *Cell* 116 : 235-246. [R]

Song, M. S., L. Salrnena and P. P. Pandolfi 2012. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Rev. Mol. Cell Biol* 13: 283-296. [R]

Stratton, M. R. 2011. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* 331: 1553-1558. [R]

Ventura, A and T. Jacks. 2009. MicroRNAs and cancer : short RNAs go a long way. *Cell* 136: 586-591. [R]

Vogelstein, B., N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz Jr. and K. W. Kinzler. 2013. Cancer genome landscapes. *Science* 339: 1546-1558. [R]

Vousden, K. H. and C. Prives. 2009. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* 137: 413-431. [R]

Wood, L. D. and 41 others. 2007. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318: 1108-1113. [P]

Kanser Biyolojisi ve Kanser Tedavisinde Moleküler Yaklaşımlar

Amakye, D., Z. Jagani and M. Dorsch 2013. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Med.* 19: 1410-1422 [R]

Arteaga, C. L. and J. A Engelman. 2014 ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* 25: 282-303. [R]

Chong, C. R. and P. A Jänne. 2013. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nature Med.* 19: 1389-1400. [R]

de The, H. and Z. Chen. 2010. Acute promyelocytic leukemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nature Rev. Cancer* 10: 775-783. [R]

Druker, B. J. 2002. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. *Oncogene* 21: 8541-8546. [R]

Engelman, J. A 2009. Targeting PI3K signaling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Rev. Cancer* 9: 550-562. [R].

Flaherty, K. T., F. S. Hodi and D. E Fisher. 2012. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nature Rev. Cancer* 12: 349-361. [R]

Fruman, D. A. and C. Rommel. 2014. PI3K and cancer : lessons, challenges and opportunities. *Nature Rev. Drug Disc.* 13: 140-156. [R]

Gschwind, A, O. M. Fischer and A. Ullrich. 2004. The discovery of receptor tyrosine kinases: Targets for cancer therapy. *Nature Rev. Cancer* 4:361-370. [R]

Haber, D. A, N. S. Gray and J. Baselga. 2011. The evolving war on cancer. *Cell* 145: 19-24. [R]

Herbst, R. S., M. Fukuoka and J. Baselga. 2004. Gefitinib-A novel targeted approach to treating cancer. *Nature Rev. Cancer* 4: 956-965. [R]

Holderfield, M., M. M. Deuker, F. McCormick and M. McMahon. 2014. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nature Rev. Cancer* 14: 455-467. [R]

Imai, K. and A Takaoka. 2006 Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature Rev. Cancer* 6: 714-727. [R]

Janne, P. A, N Gray and J. Settleman. 2009. Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors *Nature Rev. Drug Disc* 8: 709-723. [R]

Kerbel, R. S. 2006. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? *Science* 312: 1171-1175. [R]

Lo, J. A and D. E Fisher. 2014. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science* 346: 945-949. [R]

Luo, J., N. L. Solimini and S. J. Elledge. 2009. Princip les of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136: 823-837. [R]

O'Hare, T., A. S. Corbin and B. J. Druker. 2006. Targeted CML therapy: Controlling drug resistance, seeking cure. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 16: 92-99. [R]

Rahman, N. 2014. Realizing the promise of cancer predisposition genes. *Nature* 505: 302-308. [R]

Samatar, A. A. and P. I. Poulikakos. 2014. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nature Rev. Drug Disc.* 13: 928-942. [R]

Sawyers, C. L. 2004. Targeted cancer therapy. *Nature* 432: 294-297. [R]

Sellers, W. R. 2011. A blueprint for advancing genetics-based cancer therapy. *Cell* 147: 26-31. [R]

Sharma, S. V. and J. Settleman. 2007. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev.* 21: 3214-3231. [R]

Varmus, H. 2006. The new era in cancer research. *Science* 312: 1162-1165. [R]

Weinstein, I. B. 2002. Addiction to oncogenes-The Achilles heal of cancer. *Science* 297: 63-64. [R]

Weisberg, E., P. W. Manley, S. W. CowanJacob, A Hochhaus and J.D. Griffin. 2007. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinibresistant chronic myeloid leukemia. *Nature Rev. Cancer* 7: 345-356. [R]

Soruların Yanıtları

Bölüm 1

1. Stanley Miller'in deneyi, indirgen gazların karışımından çeşitli amino asitleri içeren organik moleküllerin kendiliğinden oluştuğunu göstermiştir.
2. RNA, benzersiz bir şekilde, kalıp olarak hizmet verirken kendi replikasyonu için gerekli olan kimyasal reaksiyonları katalizleyebilmektedir.
3. Mitokondri ve kloroplastlar, bakterilere benzer boyutlarda olan kendi DNA ve ribozomlarını bulundururlar ve bakteriler gibi bölünürler. Bu organellerin ribozomal proteinleri ve RNA'ları da ökaryotik genom tarafından kodlananlara kıyasla bakterilerinkine daha fazla benzerlik gösterirler.
4. Fotosentez sonucu olarak Dünya atmosferindeki O_2 artmıştır.
5. Kürenin hacmi $4/3\pi r^3$ formülü ile hesaplanır ve r = yarıçaptır. Hücrelerin hacimleri, yarıçaplarının küpleri ile orantılı olduğu için *S. aureus*'a kıyasla makrofajın göreceli hacmi, yarıçapların küpülerinin oranıdır. $25^3/0.5^3 = 125{,}000$.
6. Ökaryotik DNA replikasyonunun çalışılmasında en basit sistemi maya sağlamaktadır.
7. Fareler
8. Havanın kırılma indeksi 1.0'dir; yağın kırılma indeksi yaklaşık olarak 1.4'dür. Çözünürlük = $0.61/\eta \sin \alpha$ (η kırılma ideksidir) olduğu için, örneği yağ içinde gözlemlemek yerine hava içinde gözlemlemek kırılma indeksi çözünürlük limitini yaklaşık 0.2 μm'den 0.3 μm'ye değiştirir.
9. Çözünürlük = 0.6λ / NA. görünür ışık için $\lambda = 0.5$ μm alındığında, NA=1.3 olan objektif nesneyi 0.23 μm uzaklıkta gösterecektir. Görüntünün büyütmesi başka yollarla da elde edilebilir (örneğin tarama ekranında veya daha fazla büyütmeli oküler mercekler kullanarak). Bu nedenle, en iyi seçenek, 60x büyütmeye sahip objektif ve 1.3 olana numerik açıktır.
10. GFP kuyruklu proteinler canlı hücre içinde ürettirilebilir ve böylece bu proteinlerin floresan antikorlarla boyanması için hücrelerin fikse edilmesine ve öldürmesine ihtiyaç duyulmaz.
11. Hız santrifügasyonu boyut ve şekillerine göre organelleri birbirinden ayırırken, denge santrifügasyonu onları yoğunluklarına göre (boyut ve şeklinden bağımsız olarak) ayırır.
12. Serum, kültür ortamındaki birçok hayvan hücresinin bölünmesinin uyarılması için ihtiyaç duyulan büyüme faktörlerini içerir.
13. Primer hücre kültürü bir organizma veya dokudan doğrudan büyütülen hücrelerdir. Ölümsüz hücre hatları, kültürde sürekli üreme kabiliyetine sahiptir.
14. Bu hücreler, yetişkin organizmanın tüm farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneklerini korurlar. Böylece, çeşitli hastalıkların transplantasyon terapisi ile tedavisinde kullanılabilme potansiyeli sunarlar.

Bölüm 2

1. Su, polar bir molekül olup hidrojenleri ile oksijeni, diğer polar organik moleküllerin ve inorganik iyonların yanısıra, kendi aralarında hidrojen bağları kurabilir (böylece su, yerkürenin sıcaklıklarının çoğunluğunda sıvı halde kalır). Buna karşın, nonpolar moleküller ya da molekül kısımları su ile etkileşime giremeyip kendi içlerinde birleşerek hücre ve organel zarları gibi önemli yapıları oluşturur.
2. Glikojen temel olarak α (1→4) glikozidik bağlarla bağlanan bir glukoz polimeri olup, zaman zaman dallanmayı oluşturan α (1→6) bağlara sahiptir. Selüloz, düz zincirli, glukozlar arasında α (1→4) bağları bulunan dallanmamış bir polimerdir.
3. Yağlar hücrelerin yağ damlacıklarında birikirler ve verimli bir enerji deposudurlar. Fosfolipidler hücre zarlarının temel bileşenleri olarak işlev görürler.
4. Nükleotidler, kimyasal enerjinin taşıyıcısı (örn. ATP) ve de hücre-içi sinyal molekülleri olarak (örn. siklik AMP) işlev görürler.
5. Hayır. Nükleik asitlerdeki bilgi, bazlarının dizilimi ile iletilir. Bazlar uzaklaştırıldığında, ortaya, çok az bilgi içeriği olan düz bir şeker-fosfat zinciri kalır.
6. Christian Anfinsen ve arkadaşları, denatüre olmuş ribonükleazın, diğer hücresel bileşenlerin yokluğunda, kendiliğinden aktif enzim durumuna yeniden katlanabileceğini gösterdiler. Bu, katlanma için gereken bilginin ribonükleazın birincil yapısında bulunduğunu gösterdi.
7. Sistein'in yan zinciri diğer bir sistein ile kovalent disülfür köprüsü oluşturabilen bir sülfidril grubu içerir

ki bu, hücre yüzeyini ve salgılanan proteinleri stabilize eder.

8. Kolesterol, zarların içine alınarak zar akışkanlığını regüle eder. Ek olarak, kolesterol steroid hormonların sentezinde kullanılır.

9. α-Helezon yapısı peptid bağlarının CO ve NH gruplarının, kendileri ile hidrojen bağı yaparak polar özelliklerini nötralize etmelerini sağlar. β fıçı yapıları da lipid çift tabakayı geçebilir.

10. d seçeneği. Alanin listede, zar lipidlerinin yağ asitleri ile etkileşime girebilen tek hidrofobik yan zincirli amino asittir.

11. Aspartat, tripsin'in substratlarındaki bazik amino asitler ile etkileşime giren, asit özellikte bir amino asittir. Aspartat'ın bir lizin (bazik amino asit) ile yer değiştirmesi substrat bağlama ve katalizi engelleyebilir.

12. Histidin'in yan zinciri, fizyolojik pH'da yüksüz ya da pozitif yüklü olabilir ki bu, onun hidrojen iyonlarının değişiminde kullanılabilmesini sağlar.

13. Kanal proteinleri zarda açık porlar oluşturur. Buna karşın, taşıyıcı proteinler küçük moleküllere seçici olarak bağlanarak taşımayı gerçekleştirirler.

Bölüm 3

1. Enerjetik olarak elverişsiz bir tepkime, yüksek negatif serbest enerji değişimi gösteren enerjetik olarak elverişli bir tepkimeyle (sıklıkla ATP hidrolizi) kenetlenerek, birleşik tepkimenin enerjetik yönden elverişli olması sağlanır.

2. Fosfofruktokinaz tarafından katalizlenen reaksiyon şudur:

   Fruktoz-6-fosfat + ATP⟶ fruktoz 1,6-bisfosfat + ADP.

   Standart serbest enerji değişimi aşağıdaki şekilde hesaplanabilir:

   Fruktoz-6-fosfat ve fosfat'tan fruktoz-1,6-bisfosfat oluşumundaki serbest enerji değişimi ($\Delta G^{o\prime}$= +4 kkal/mol) ile ATP hidrolizinin serbest enerji değişimi (-7.3 kcal / mol) 'nin toplamı ki, kenetlenmiş reaksiyon için -3.3 kcal / mol'lük bir standart serbest enerji değişimi elde edilir.

3. Verilen değerler aşağıdaki denkleme yerleştirildiğinde:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln \frac{[B][C]}{[A]}$$

   şu sonuç elde edilir:

   ΔG = -1.93 kkal / mol.

   Böylece, reaksiyon soldan sağa ilerler ve hücrede A, $B + C$'ye dönüştürülür.

4. Fosfofrüktokinaz yüksek ATP konsantrasyonları ile inhibe olur. Böylece, artmış hücre ATP konsantrasyonlarına yanıt olarak, fosfofrüktokinaz inhibe olur.

5. Anaerobik koşullarda glukoz sadece glikoliz ile metabolize olarak glukoz molekülü başına net olarak 2 ATP molekülü üretilir. Aerobik koşullarda, glukoz tamamen okside olarak 36-38 ATP molekülü oluşur.

6. Anaerobik koşullarda glikoliz sırasında üretilen NADH, piruvat'ın etanol ya da laktat'a indirgenmesinde kullanılır ki, NAD^+ rejenere edilir.

7. Lipitler yağ asitlerine göre daha fazla redükte olduklarından, oksitlenmeleri ile molekül başına çok daha fazla enerji açığa çıkar.

8. 1 pH biriminin proton gradienti, on kat daha yüksek $[H^+]_o$'a karşılık gelir. Bu değerler aşağıdaki denkleme yerleştirildiğinde:

   $\Delta G = RT \ln [H^+]_i / [H^+]_o$.

   -1.4 kkal / mol civarında bir sonuç alınır.

9. Koenzim Q , kompleks I veya kompleks II'den bir çift elektron alarak kompleks III'e taşır. Koenzim Q'da, mitokondri matriksinde iki proton bağlayarak iç zar boyunca taşır ve zarlar arası boşluğa bırakır ve böylece bir proton gradient oluşturur. Sitokrom c, zarlararası boşlukta bulunan ve kompleks III'den bir elektron çifti alarak kompleks IV'e taşıyan küçük bir proteindir.

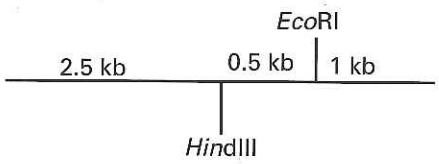
10. Her bir H_2O molekülünü ayırmak için iki adet yüksek enerjili elektron gerekir; böylece, herbir glukoz molekülünün sentezinde 24 adet yüksek-enerjili elektron gerekir. Bu elektronların iki fotosistemden geçişleri, 12 NADPH molekülü ile (proton pompası ve sitokrom *bf* kompleksine bağlı olarak) 12-18 ATP molekülü üretir. Calvin siklusu için 18 ATP molekülü gerektiğinden, glukozun sentezi, döngüsel elektron akışında üretilen ilave ATP'ler gerektirebilir.

11. Işık reaksiyonlarında, klorofiller tarafından ışığın soğurulmasından elde edilen enerji, su'yu $2H^+ + ½\ O_2 + 2e^-$ 'e ayrıştırmak için kullanılır. Elektronlar, ATP ve NADPH'ın üretilmesi ile sonuçlanan elektron transport zincirine girerler. Karanlık reaksiyonlar sırasında, ATP ve NADPH, glukozun CO_2 and H_2O den sentezini sağlar.

12. Glikolizin bazı reaksiyonlarında yüksek bir serbest enerji azalması ortaya çıkar ve bu durum kolayca geri dönüşebilir değildir. Glukoneogenezde, bu reaksiyonlar, ATP ve NADH kullanımı ile ilerleyen başka reaksiyonlar tarafından atlanır.

Bölüm 4

1. İki farklı gende mutasyon taşıyan sinekleri eşleştirirsiniz. Eğer, iki gendeki mustasyonlar sıklıkla birlikte kalıtılırsa genler bağlantılıdır ve aynı kromozom üzerinde yerleşiktir.
2. DNA'nın yarısı orta ağırlıkta, diğer yarısı hafif ağırlıkta olur.
3. Bir veya iki nükleotidin eklenmesi genin okuma çerçevesini bozarak, kodlanan proteinin tamamen farklı bir amino asit diziliminde olmasına neden olur.
4. Bir insan DNA parçasını klonlamak için, doğrusal kromozom benzeri bir molekül gibi replike olabilmesi için bir yapay maya kromozomunun telomerlerlerine ve bir sentromere, ayrıca replikasyon orijinine ve bir *Eco*RI kesim bölgesine ihtiyaç vardır.
5. UGC'de sistein kodladığı için, bu mutasyonun enzim fonksiyonu üzerine etkisi yoktur. Ancak, UGA bir "dur" kodonudur. Dolayısıyla bu mutasyon, inaktif olabilecek erken sonlanmış bir proteinin sentezine neden olur.
6. Restriksiyon haritası şu şekildedir.



7. Haploid sperm, DNA dizisinin tek bir başlatıcı kopyasını içerir. Her PCR döngüsü, başlangıç materyalini iki katına amplifiye eder. Dolayısıyla 10 döngü, yaklaşık olarak bin kopya verir. 30 döngülük amplifikasyon ise yaklaşık 2^{30} veya bir milyardan fazla kopya verir.
8. Tablo 4.3'e göre cosmid' ler 30-45 kb eklenti taşır. Tablo 4.2'ye göre *Bam*HI'ın tanıma dizisi 6 baz çifti uzunluğundadır ve rastgele oluşma sıklığı her 4000 baz çifti DNA'da birdir (4^6=4096). 30,000-45,000, 4000'e bölündüğünde, bir cosmid'deki eklentide yaklaşık 10 *Bam*HI fragmanı bulunması beklenir.
9. İnsan genomu yaklaşık $3x10^6$ kb'dir ve bir BAC vektörü eklentisi 120-300 kb uzunluğundadır (bkz. Tablo 4.3). Genom boyutunun eklenti boyutuna bölünmesi, genomu temsil edebilmesi için en az 10,000-25,000 BAC klonunun gerektiğini gösterir.
10. İnfluenza virüs replikasyonu, RNA-güdümlü RNA sentezidir. Dolayısı ile Actinomycin D (DNA-güdümlü RNA sentezini baskılar) influenza virüsünün replikasyonunu etkilemeyecektir.
11. Klonlama vektörünün kritik özelliği, seçilebilir bir belirteç (marker) olabilir. Örneğin, kalıcı transfekte hücreleri seçmenize imkan verecek antibiyotik direnci gibi.
12. Proteinler negatif yüklü deterjan olan SDS içeren solüsyonu içinde çözünürler. Her protein, kendisine net bir negatif yük kazandıracak çok sayıda SDS molekülüne bağlanır. Bundan sonra, proteinler boyutlarına göre elektroforez ile ayrıştırılabilir.
13. CRISPR/Cas sistemi, bir RNA molekülü ile homolog olan özgün bir diziyi hedefler. İstenilen bir hedef diziye homolog olan RNA'lar kolaylıkla sentezlenebildiği için, bu yöntem, memeli hücrelerinde hedeflenmiş bir mutasyon oluşturmada oldukça etkindir.

Bölüm 5

1. Protein kodlayan diziler, dur kodonu içermeyen uzun polipeptidleri kodlayabilen nükleotid dizleri olarak belirlenebilirler.
2. İnsan genomunda protein-kodlayan diziler (yaklaşık % 1), *S. cerevisae* (% 70) ile karşılaştırıldığında çok daha azdır.
3. Elmada protein kodlayan genlerin sayısı, insanda protein kodlayan gen sayısının iki katından daha fazladır.
4. Bir protein küçük peptidler oluşturacak şekilde sindirilir, bunların kütle-yük oranı kütle spektrometresiyle belirlenir. Deneysel olarak belirlenmiş kütle spektrumları daha sonra, ilgilenilen proteinlerin belirlenmesi amacıyla bütün bilinen protein veri tabanlarıyla karşılaştırılabilir.
5. Hem kanser hem de normal hücre mitokondrileri hücrelerin alt bölümlerine ayrıştırılması (*subcellular fractionation*) yoluyla izole edilebilir. Protein bileşenleri daha sonra "shotgun" kütle spektrometresi ile belirlenebilir.
6. Bir protein, hücre ekstraktından immün-çöktürülmüş hedef protein-hücre içinde normalde etkileştiği proteinlerle birleşik kalacak şekilde, ılımlı koşullarda immünopresipite edilebilir. İmmünopresipite edilen protein kompleksleri, hedef proteinle birlikte çökeltilen proteinlerin belirlenmesi için daha sonra kütle spektrometresi gibi yöntemlerle analiz edilebilir.
7. Hem meme kanseri hücreleri hem de normal hücreler, meme kanseri büyümesini engelleyen ancak normal hücreleri etkilemeyen siRNA'ların belirlenmesi amacıyla taranabilir. Bu siRNA'lar ile özellikle meme kanseri hücrelerinin büyümesi için gerekli olan genleri tanımlanabilir.
8. Yeni nesil dizileme bir hücrede eksprese olan bütün RNA'ların dizilenmesi için kullanılabilir, böylece transkribe olmuş bütün dizilerin tanımlanabilir.
9. Protein kodlayan dizilerin aksine, düzenleyici dizilerin büyük genomlarda şans eseri sıklıkla rastlanan, kısa ve yetersiz tanımlanmış diziler olmaları, işlevsel

düzenleyici dizilerin belirlenmesini güçleştirir. İşlevsel düzenleyici dizilerin belirlenmesi için kullanılan yaklaşımlar, evrimde korunmuş diziler olarak düzenleyici dizi kümelerinin aranması ve koordine bir şekilde regüle edilen genlerde bulunan dizilerin aranmasını içerir.

10. Sentetik biyologlar, doğada var olan hücrelerdeki (doğal) davranışları yöneten ilkelerin daha iyi anlaşılması için, sentetik (doğal olmayan) biyolojik sistemler tasarlarlar.

Bölüm 6

1. Genomları daha büyük organizmalar kompleks olanlardan daha fazla miktarda kodlamayan DNA içerir.
2. Phillip Sharp ve çalışma arkadaşları, adenovirüs hexon mRNA'sı ve tek iplikli bir viral DNA molekülünden oluşan hibrid moleküller oluşturmuşlardır. Araştırmacılar hibrid molekülleri elektron mikroskobu ile incelediklerinde, hexon mRNA'sının farklı virüs DNA bölgeleri ile hibridize olduğunu, aradaki hibridize olmayan DNA'nın ilmekler oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Tek iplikli DNA'nın oluşturduğu ilmekler, uzun primer transkriptten kesilip çıkarılan intronlara karşılık gelir.
3. Alternatif kesilip-eklenme sayesinde aynı genden birden fazla protein sentezlenebilir ve böylelikle sınırlı sayıda genden eksprese edilen protein çeşitliliği artmış olur.
4. Farklı baz kompozisyonları nedeni ile basit dizi tekrarları (örn. ACAACT) DNA'nın genelinden, sahip olduğu ortalama AT/GC oranı bakımından farklıdırlar. Bu tekrarların ardışık kopyalarını barındıran diziler, CsCl yoğunluk-gradyanı santrifügasyonu sonrası genomik DNA'nın ana bandından ayrı uydu bantlarda toplanırlar.
5. Kodlamayan RNA'lar gen ekspresyonunu transkripsiyon düzeyinde (uzun-kodlamayan-RNA'lar) ya da mRNA'ların translasyonunu ve dayanıklılığını (miRNA'lar) etkileyerek düzenleyebilirler.
6. Bir işlenmiş psöudogen intron içermez.
7. *S. cerevisiae* sentromeri küçüktür (125 baz çifti) ve muhtemelen sınırlı sayıda kinetekor proteinine bağlanarak bir mikrotübül bağlanma bölgesi oluşturur. Hayvan kromozomlarındaki sentromerler çok daha büyüktür ve birden fazla miktroübüle bağlanma bölgeleri oluşturan tekrar dizileri içerirler.
8. Plazmidin bir restriksiyon endonükleaz ile kesilmesi, doğrusal ve iki serbest ucu olan, ancak telomer içermeyen bir kromozom oluşturur. Kromozom uçlarının dayanıksızlığı nedeniyle plazmid genleri kısa süre içinde elenirler. Bunu denemek için, doğrusallaştırılmış plazmidin uçlarına telomer dizileri ekleyerek plazmidin istikrarlı biçimde kalıtılıp kalıtılmadığına bakılabilir.
9. Bir histon H1 molekülü, genomik DNA'ya her 200 baz çiftinde bir bağlanır. Böylece, maya genomuna bağlı H1 molekül sayısını belirlemek için maya genom büyüklüğü (12 Mb) 200 bp'ye bölünerek 60,000 sayısı elde edilebilir.
10. Tablo 6.1'den faydalanarak, ortalama insan intronunun uzunluğunu hesaplamak için tüm intron dizilerinin toplam uzunluğu, ortalama bir insan genindeki intron sayısına bölünebilir: yaklaşık olarak 5800 bp.
11. Tablo 6.1'e göre, ortalama bir insan geninin ekzon dizi uzunluğu 4300 bp'dir. Bu uzunluğun, kütüphanenizdeki eksiksiz cDNA insertlerinin ortalama uzunluğu kadar olması beklenir.
12. Bitkiler, tüm genomlarındaki duplikasyonların bir sonucu olarak, çok sayıda duplike gen içerirler.

Bölüm 7

1. Yüksek sıcaklık mutantlarında, Okazaki fragmanlarındaki RNA primerlerinin DNA ile yer değiştirmesinde ve kesip-çıkarma tamiri sonrasında DNA'daki boşlukların doldurulmasında bozukluklar olabilir.
2. Topoizomeraz I, DNA çift sarmalındaki bir ipliği keser ve bükülme gerilimini azaltmak için, kesilen ipliğin diğer iplik etrafında dönmesini sağlar. Topoizomeraz II, DNA çift sarmalının iki ipliğini de keser ve iç içe geçmiş molekülleri çözmek için (örn., mitoz sırasında), diğer DNA molekülünü bu kesikten geçirir.
3. Tablo 5.1'de, maya genomunun büyüklüğü 12 Mb (12 milyon baz çifti) iken, Okazaki fragmanlarının uzunluğu 1-3 kb'dir (1000-3000 baz çifti). Genomun büyüklüğü Okazaki fragmanlarının uzunluğuna bölünerek replikasyon esnasında sentezlenen Okazaki fragmanlarının sayısı hesaplanabilir. Bunun sonucunda da cevabın 4,000-12,000 parça olduğu bulunur.
4. DNA polimerazlar DNA sentezini *de novo* başlatamazlar. Yalnızca daha önceden oluşmuş primer ipliğine nükleotid ekleyebilirler. Primaz, DNA polimeraz tarafından daha sonra uzatılan kısa RNA primerleri sentezleyerek, DNA sentezini *de novo* başlatır.
5. 3′ den 5′ e ekzonükleaz aktivitesi yeni sentezlenen DNA'da yanlış düzeltme (proofreading) amacıyla yanlış eşleşmiş bazların kesip çıkartılması için gereklidir. DNA polimeraz III'ünde bu aktivitenin olmadığı mutant *E. coli*'de, her DNA replikasyonunda yüksek mutasyon sıklığı görülür.
6. Replikasyon orijini olmayan plazmide DNA sekansı yerleştirilerek, büyümek için rekombinant plazmidin

genine ihtiyaç duyan mutant mayanın rekombinant plazmid tarafından transforme olup olmadığına karar verilir. Yalnızca fonksiyonel orijinleri olan plazmidler yüksek frekansta transforme olmuş maya kolonileri oluşturur.

7. DNA polimerazlar DNA moleküllerinin uçlarını replike edemezler; maya hücreleri lineer kromozomların uçlarının sürekliliği için telomerazı geliştirmişlerdir. *E. coli* genomu dairesel bir DNA molekülü olduğundan ve uçları bulunmadığından, lineer DNA'nın uçları için kullanılan özel mekanizmalara ihtiyaç duymaz.
8. DNA-çift zincir kırıkları rekombinasyonel tamir ile onarılabilir. Bu tamirde, kromozomun kaybolan kısmı homolog kromozomdan alınabilir. Tek-zincir kırıkları ise hasar görmemiş komplementer ipliğin hasar görmüş iplikten çıkarılan kısmının sentezininde kalıp olarak kullanılabilmesinden dolayı kesip çıkarma ile onarılabilir.
9. Deri kanserinin frekansının artması solar UV radyasyonla oluşan DNA hasarına bağlı olup, bu tip hasarlar nükleotid kesip-çıkarma tamir sistemi ile onarılır. Bu tip hasarların, diğer kanser tiplerinin oranında artışa sebep olmaması, benzer tip hasara iç organlarda sık rastlanmadığını ve bu organlara yönelik bir çok kanserin diğer mutasyonlardan (ör., DNA replikasyonu esnasında hatalı baz eşleşmesi) kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.
10. Bu ilaçlar tarafından etkilenebilecek hücresel süreçler; telomerlerin telomerazlar tarafından sürekliliğinin sağlanması ve retrotranspozonların transpozisyonudur.
11. İnsanlarda, yanlış eşleşme tamiri yeni replike olmuş DNA'yı tanımak için atasal iplikteki metilasyon yerine, tek-zincir kırıklarını kullanır.
12. Fare, immünglobulin ve T hücre reseptör genlerini tekrardan düzenleyemediği için hem B hem de T lenfositlere sahip olmadığından immün yetersiz olur.

Bölüm 8

1. Sigma faktörleri transkripsiyon başlama bölgesinin yukarı yönündeki dizilere bağlanırlar, RNA polimerazı özgül olarak promotör bölgeye getirerek transkripsiyonu başlatırlar.
2. Sonlanmanın en yaygın tipi, komplementer baz eşleşmesi ile kararlı bir sap-ilmek yapısı oluşturan, GC-zengin ters tekrarların transkripsiyonu ile ilgilidir. Bu yapının oluşması mRNA ile DNA arasındaki etkileşimi bozar ve transkripsiyonu sonlandırır.
3. Bir represörün operatöre bağlanması, RNA polimerazın promotöre bağlanmasını engelleyerek, transkripsiyonu bloklar.
4. TATA kutusu içeren promotörler TBP veya TFIID varlığında *in vitro* olarak transkribe olabilir. Ancak, Inr dizisi TBB tarafından değil TAF'lar tarafından tanındığı için, Inr promotörü transkripsiyon için TFIID'ye ihtiyaç duyar.
5. Güçlendiricilerin aktivitesi, ne transkripsiyon başlama bölgesine mesafesine ne de yönüne bağlı değildir. Promotörler transkripsiyon başlama noktasına yakınlıklarına göre tanımlanırlar.
6. Dizi elemanının, bir doku-spesifik represör için, bir bağlanma bölgesi olabilir.
7. Yalıtıcılar kromozomları kromatin yapısına göre, heterokromatin ve ökromatin olabilecek, bağımsız bölgelere ayırır, fakat bir yalıtıcı ötesine gidemez. Aynı zamanda bir güçlendiricilerin başka bir bölgedeki promotörleri etkilemesini de engellerler.
8. Birçok lncRNA, kromatin yapısını değiştiren proteinler ile kompleksler oluştururlar ve bu kromatin-modifiye eden kompleksleri hedef genlerine yerleştirirler. Buna ek olarak bazı lncRNA'lar transkripsiyon faktörleri ile, mediyatörlerle veya bazal transkripsiyon düzeneği ile, diğer bazı lncRNA'lar ise mRNA işlenmesini ve translasyonu düzenleyen proteinlerle ile etkileşime girerler.
9. Sp1'in bir DNA dizisinin GC kutusuna yüksek afinite ile özgün olarak bağlanmasından, DNA-afinite kromatografisi ile biyokimyasal saflaştırma için yararlanılmıştır. Saflaştırılmış proteinin Sp1 olduğunu göstermek için *in vitro* transkripsiyon ölçümü yapılabilir.
10. Anti-Sm antiserumu snRNP'lere bağlanır ve onların kesilip-eklenme (*splice*) bölgelerine bağlanmasını önler, böylece kesilip-eklenme (*splicing*) baskılanır.
11. Nükleozomlara komşu promotörler ve güçlendiricilerde, kromatin immün-çöktürme ile ayırt edilebilen farklı histon modifikasyonları bulunur. Promotörler H3 lizin-4'ün trimetile formu ile işaretlenirken, güçlendiriciler bu lizinin monometile formu ile tanımlanırlar.
12. Kesilip-ekleme (*splicing*) faktörleri, pre-mRNA'daki özgül dizilere bağlanarak, snRNP'leri doğru kesilip-ekleme bölgelerine yönlendirirler.
13. Apo-B100 karaciğerde düzeltilmemiş (*unedited*) mRNA'nın translasyonu ile sentezlenir. Daha kısa Apo-B48 bağırsakta, düzeltilmiş bir mRNA'nın translasyonu ile sentezlenir. Bu düzeltilmiş mRNA'da düzeltme sırasında bir dur kodonu oluşturulur.
14. Anlamsız-aracılı mRNA yıkımı, tam bir açık-okuma çerçevesi olmayan mRNA'ların yıkılmasını sağlayan bir kalite kontrol sürecidir. Bu süreç, anormal kesilmiş proteinler oluşturabilecek hatalı mRNA'ları ortadan kaldırır.

Bölüm 9

1. Birçok tRNA birden fazla kodonu tanıyabilir, çünkü antikodonun 3. bazı olağan komplementer eşleşme dışında, standart olmayan yollarla "hidrojen bağı" yapabilir veya kararsız bir yakınlaşma "wobble" oluşturabilir.
2. Bakteri ribozomuna bağlanmak için bir Shine-Dalgarno dizisi gereklidir.
3. Ribozomlar ortadan kaldırıldığında çoğu protein polipeptid olarak sentezlenebilir, ancak RNaz ile muamele translasyonel aktiviteyi tamamen bozar. Buna ek olarak, 50S ribozomal alt ünitenin yüksek-çözünürlükte yapısal analizleri peptidil transferaz reaksiyonunun oluştuğu bölge ribozomal proteinlerden değil, rRNA'dan oluşmuştur.
4. Poliadenilasyon gelişimin erken dönemlerinin önemli bir translasyon düzenlenme mekanizmasıdır. İnhibisyonu döllenme sonrası birçok oosit mRNA'sının translasyonunu bloklayacaktır.
5. Şaperonlar diğer proteinlerin doğru katlanmasına yardım eden proteinlerdir. Yüksek sıcaklıklar proteinleri denature edebilir. Isı-şok proteinleri, bu denature proteinlerin yeniden katlanmasına yardım eden, böylece protein fonksiyonlarının geri kazanılmasını sağlayan şaperonlardır.
6. Fosfolipaz uygulaması hücre yüzeyindeki bir GPI-bağlı proteinin serbest kalmasına sebep olacaktır, ancak transmembran protein etkilemeyecektir.
7. Hücrelerin mitozdan çıkmasını sağlayan siklin B'nin yıkılması için "yıkım kutusu" denilen özgül-9-amino asit dizisi gereklidir. Bu dizideki mutasyonlar übikütinasyonu ve siklin B'nin yıkılmasını engelleyerek, mitozdan çıkışı bloklar.
8. Hayır. Proteinlerin yıkım için hedeflenmesine ek olarak, bir proteinin übikütinasyonunun, hedef proteinlerin endositoz için hedeflenmesi ve transkripsiyonu düzenleyen histonları modifiye etmek gibi diğer fonksiyonları da vardır.
9. miRNA'lar spesifik mRNA'ları RISC kompleksi yoluyla hedefleyebilir, bu da ya mRNA'nın yıkımı ile ya da translasyonun engellenmesi ile olur.
10. 3'UTR dizileri, düzenleyici faktörlerin ve miRNA'lar için bağlanma bölgeleri
11. Proteinleri özgül hücresel bölümlere hedefleyen sinyal dizileri, sıklıkla sinyal peptidazların etkisi ile uzaklaştırılırlar. Ek olarak, birçok protein büyük bir öncül protein olarak sentezlenir ve proteolitik olarak işlendiğinde olgun protin elde edilir.
12. Küçük ribozomal alt ünitedeki bir "kod açma merkezi" kodon-antikodon baz eşleşmelerini tanıyarak düzeltir ve hatalı eşleşmeleri ayırır. A bölgesine doğru bir aminoaçil tRNA'nın yerleşmesi GTP bağlı eEF1α'nın hidrolizine ve GDP bağlı uzama faktörünün serbest kalmasına neden olan bir konformasyonel değişikliği uyarır.
13. PDI disülfit bağlarının oluşmasını katalizler. PDI'nın siRNA ile inhibisyonu RNaz'ın doğru katlanmasını engelleyecek, böylece siRNA eksprese eden hücrelerin kültür ortamında çok daha düşük RNaz aktivitesi belirleyeceksiniz.

Bölüm 10

1. Prokaryotik mRNA'lar transkripsiyonla eş zamanlı olarak translasyona uğrarlar. Ökaryotlarda transkripsiyon ile translasyonun farklı kompartmanlarda gerçekleşmesi, mRNA'ların alternatif kırpılma, poliadenilasyon ve sitoplazmaya kontrollü taşınım gibi transkripsiyon sonrası işlemlerle düzenlenmesine olanak tanır. Ayrıca, transkripsiyon faktörlerinin nükleusa yerleşimlerinin kontrolü ile de transkripsiyon düzenlenebilir.
2. Laminler, nükleer zarfı destekleyen ve sağlamlaştıran ipliksi bir yapı oluştururlar. Laminler ayrıca, kromatinin nükleer zarf içine tutunmasını sağlayan bağlanma bölgelerine sahiptirler. Bunlara ek olarak, transkripsiyon, DNA replikasyonu ve kromatin modifikasyonunda rol oynayan pek çok protein laminler ile etkileşir.
3. 15 kd protein nükleusa girebilir ancak 100 kd protein giremez, çünkü sadece 40 kd'dan daha küçük proteinler nükleer por kompleksinden serbestçe geçebilir.
4. Ran/GTP'nin nükleer zarfın iki tarafına farklı dağılımı nükleer taşınımın yönlülüğünü belirler.
5. Nükleusa taşınımla bu düzenlemenin bir örneği NF-κB'dir. Uyarılmamış hücrelerde IκB, NF-κB'ya bağlanır ve kompleks nükleusa taşınamaz. Uyarılma sonrası, IκB fosforillenir ve übikütin-aracılı proteoliz ile parçalanır. Bu, NFκB'de bulunan bir nükleer yerleşim sinyalinin açığa çıkmasına yol açar ve NFκB'nin nükleusa girerek hedef genlerin transkripsiyonunu başlatmasına olanak tanır.
6. Transkripsiyon faktörü artık bu noktalarda fosforillenemez ve böylece konstitütif biçimde nükleusa taşınarak hedef genlerin ekspresyonunu aktifleştirebilir.
7. Nükleustan taşınım sinyalinin etkisiz kılınması, proteinin nükleusta tutulması ile sonuçlanacaktır.
8. Yeni replike olmuş DNA'yı, timidinin yerine DNA'nın yapısına katılan bromodeoksiüridin ile işaretlersiniz. Bromodeoksiüridin ile işaretlenmiş DNA, bromodeoksiüridini tanıyabilen antikorlar ve floresan mikroskopisi yardımı ile lokalize edilebilir.

9. Smith ve arkadaşları, T antijeninin 126 ile 132. amino asitleri arasında kalan bölgeyi, normalde sitoplazma yerleşimli olan β-galaktosidaz ve piruvat kinaz proteinleri ile birleştirmişlerdir. Bu füzyon proteinleri nükleusta birikmiştir.
10. Nükleer benekler konsantre biçimde snRNP popülasyonları içerir ve bu beneklerin, kırpılma bileşenlerinin depolama alanları oldukları düşünülmektedir.
11. Küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar) nükleolusa yerleşimlidirler ve burada rRNA'ların kesimi ile modifikasyonunda rol alırlar.
12. Eksportin-t, tRNA'ların nükleus dışına taşınımları için gereklidir. Eksportin-t fonksiyonunun inhibisyonu, tRNA'nın nükleus dışına taşınımını engelleyecek ve böylece translasyonun inhibisyonuna yol açacaktır.

Bölüm 11

1. George Palade ve arkadaşları, yeni sentezlenen proteinlerin yapısına katılacak radyoaktif amino asitler ile pankreatik asiner hücreleri işaretledi. Çekilen radyografiler işaretli proteinleri ilk önce kaba ER'da görüntüledi. "İz sürme" (*pulse-chase*) olarak bilinen bir yöntemle, hücreler daha sonra radyoaktif olmayan amino asitleri içeren ortamda bekletildiğinde, radyoaktif işaretli proteinlerin Golgi aygıtına geçtiği gösterilmiş; daha uzun izleme sürecinde işaretli proteinler salgı veziküllerinde ve hücrenin dışında saptanmıştır.
2. Bir salgı proteinini kodlayan mRNA *in vitro* koşullarda serbest ribozomlar üzerinde translasyona uğradığında sentezlenen protein, aynı mRNA'dan mikrozomlar varlığında kaba ER'da sentezlenen proteinden daha büyüktür. Sonra, sinyal dizisi mikrozomal veziküllerindeki bir sinyal peptidaz enzimi tarafından kesilerek uzaklaştırılır.
3. Ko-translasyonel translokasyon, yeni sentezlenmeye başlanan polipeptid zincirinin sinyal tanıyan partiküle (SRP) bağlanması ve protein sentez sürecin ile yönlendirilen bir translokon yoluyla yer değişimini kapsamaktadır. Post-translasyonel translokasyon ise polipeptid zincirini ER'a, protein sentez süreci bittikten sonra hedefler ve SRP'ye gereksinim duymaz. Bir Sec62/ 63 kompleksi, yeni sentezlenmiş polipeptid zincirini tanır ve translokon kanalına girmesini sağlar. Polipeptid zinciri BiP şaperon proteini tarafından ER lümenine çekilir.
4. Sec61 mutantlarında Golgi aygıtına gidecek proteinler ER lümenine geçemeyecekleri için, sitozolde birikirler.
5. Karbohidrat grupları, her ikisi de topolojik olarak hücre dışına karşılık gelen, ER lümeni ve Golgi aygıtında eklenirler.
6. ER'da yerleşik bir proteinin KDEL dizisindeki bir mutasyon, o proteinin Golgiden ER'a dönüşüne engel olarak hücreden dışarıya salgılanmasına yol açar. KDEL reseptör proteininin inaktivasyonu ise tüm KDEL dizisine sahip ER proteinlerinin salgılanmasıyla sonuçlanır.
7. Önce bir sinyal dizisi, sentezlenmeye başlanmış lizozomal polipeptidi kaba ER'a hedefler. Polipeptid ER lümenine geçerken bir *N*-bağlı oligosakkarid proteine eklenir. Protein Golgi'ye geçtiğinde, normalde uzaklaştırılan üç mannoz ayrılmaz; bunun yerine mannoz-6-fosfata çevrilir. Bu mannoz-6-fosfatlar *trans*-Golgi ağındaki bir reseptör tarafından tanınır ve bu proteinleri lizozomlara yönlendir. Normal olarak sitozolik proteinlerde sinyal dizisi bulunmadığından ER'a geçemezler. Bu nedenle lizozoma hedefleyecek bir sinyalin etkisi olmaz. Tam aksine böyle bir eklenti normalde salgılanan bir proteini Golgi aygıtından lizozoma yönlendirir.
8. Golgi aygıtında mannoz-6-fosfat oluşumunun gerçekleşmemesi, tüm lizozomal proteinlerin salgılanmasıyla sonuçlanır.
9. Glikolipidler ve sfingomiyelin Golgi aygıtının sitozolik ve luminal yüzeylerinde, ilki için şekerlerin eklenmesiyle; ikincisi için de seramide fosforilkolin eklenmesiyle üretilir. Glukozil seramid daha sonra luminal yüzeye aktarılır. Veziküler taşıma ve membran füzyonu sonrası bu lipidler plazma membranının dış yüzeyinde yerleşim gösterirler.
10. Tanı Gaucher hastalığıdır. Bu hastalık lizozomal hidrolaz glukoserebrosidaz enziminde bir mutasyon sonucu oluştuğundan, enzimi yerine koyma tedavisi önerilebilir.
11. Lizozomlara hedeflenen enzimler, sitoplazma, ER ya da Golgi aygıtının nötr pH'sında aktif olmayan asit hidrolozlardır. Asit hidrolozlar, lizozomlarda proton pompalarıyla sağlanan asit pH'da aktive olurlar.
12. Vezikül ve hedef SNARE'lerin dolanmış-sarmal (*coiled-coil*)" bölgeleri arasındaki güçlü etkileşim, her iki membranı neredeyse doğrudan temas halinde tutar. Bu durum membran kararsızlığına yol açarak her iki membranın kaynaşmasını (füzyonunu) sağlar.

Bölüm 12

1. Mitokondri iç zarının yüzey alanı krista oluşumuna bağlı olarak yüksektir. Ayrıca zarın protein içeriği alışılagelmişin dışında yüksektir (>%70) ve birçok enzim ve elektron taşıyıcısı bulunur.
2. Mitokondri tRNA'ları wobble'ın oldukça farklı bir formunu oluşturabilir. Bu yapıda antikodondaki U mRNA'nın üçüncü kodon pozisyonunda, dört bazdan

herhangi biriyle eşleşebilir. Bu durum 4 kodunun da tek bir tRNA tarafından tanınmasını sağlar.

3. Sitozoldeki Hsp70 proteinleri yeni sentezlenen mitokondri proteinlerini katlanmamış halde tutar. Böylece bu proteinler, Tom kompleksine dahil olabilir ve katlanmamış zincir olarak içeri alınabilirler. Mitokondri matriksi Hsp70 şaperonları polipeptit zincirine Tim kompleksinden çıkarken bağlanır ve polipeptidi matriks içine çekmek için ATP hidrolizini kullanır.
4. Metabolit taşınımı için gerekli olan enerji mitokondri iç zarındaki elektrokimyasal gradiyent ile sağlanır.
5. Mitokondri iç zarı ve kloroplastların tilakoid zarı elektron taşıma ve oksidatif fosfosrilasyon bölgeleridir.
6. Mitokondrinin aksine kloroplast zarında elektrik potansiyeli yoktur. Bu nedenle, transit peptitlerin yükü protein translokasyonuna katkıda bulunmaz.
7. Kloroplast zarından taşınacak ancak tilakoid lümene yerleşmek yerine kloroplast stromasında kalacaktır.
8. Kromoplastlar, klorofil yerine karetenoid içerir ve tilakoid zara sahip değildir.
9. Birçok peroksizom transmembran proteinleri ER'de sentezlenir ve peroksizomları oluşturmak üzere birleşecek olan veziküllerle taşınır. Diğer transmembran proteinleri sitozoldaki serbest ribozomlarda sentezlenir ve membran hedefleyici sinyal aracılığıyla peroksizom zarına yönlendirilir.
10. Pex5 peroksizom matriks proteinlerinin içeri alımında temel sitozolik reseptördür. Bu yüzden Pex5'in siRNA ile susturulması birçok matriks proteininin peroksizoma taşınmasını engeller.

Bölüm 13

1. Asimetrik aktin monomerleri baş-kuyruk şeklinde bir araya gelerek aktin filamanlarını oluşturur. Tüm monomerler aynı yönde dizildiği için filamanın açık bir polaritesi vardır. Aktin filamanlarının polaritesi miyozin hareketinin yönünü belirler. Eğer aktin filamanları polar olmasaydı, miyozinin aktin ve miyozin filamanlarının kaymasına yol açan tek yönlü hareketi meydana gelemezdi.
2. Sitokalazin aktin filamanlarının artı ucuna bağlanıp uzamalarını engeller, dolayısıyla yürüyen filamanlarının depolimerizasyonuna neden olurdu. Falloidin aktin filamanlarına bağlanır ve depolimerizasyonlarını inhibe eder, dolayısıyla filamanların yürümeyi durdurmalarına ancak varlıklarını koruyarak daha uzamalarına neden olurdu.
3. Kofilin aktin filamanlarını keserek uzayan ya da depolimerize olan yeni filaman uçları yaratır. Profilin ADP-aktine başlanır ve ADP'nin ATP ile değiştirilmesini uyarır. Böylelikle uzayan filamanlara katılabilecek ATP-aktin monomerleri oluşur.
4. I bandı ve H bandı kasılma sırasında kısalır. A bandı kısalmaz çünkü kalın miyozin filamanları ile kaplanmıştır.
5. Düz kas hücrelerinin kasılması miyozin düzenleyici zincirinin miyozin hafif zincir kinaz tarafından fosforillenmesi ile düzenlenir. Bu fosforillenme de kalsiyum-bağlayıcı protein kalmodulin ilişkisi ile kontrol edilir. Kalsiyumun sitozol konsantrasyonundaki artış kalmodulinin miyozin hafif zincir kinaza bağlanmasına yol açar.
6. Mikrotübüllerin *in vitro* hareketi ATP gerektirmiş ve hidrolize edilemeyen ATP analoğu AMP-PNP tarafından engellenmiştir. Organeller, AMP-PNP varlığında mikrotübüllere tutunmuş olarak kalmıştır ve bu motor proteinlerin organel hareketinden sorumlu olanlarının da tutunmuş kalabileceğini akla getirir.
7. Kolsemid mikrotübüllerin polimerizasyonunu engellediğinden salgı veziküllerinin mikrotübüller boyunca taşınmasını inhibe ederdi.
8. γ-tübülin mikrotübül organize edici merkezin oluşumda kilit bir rol oynar. γ-tübülin diğer proteinler ile etkileşerek yeni mikrotübüllerin çekirdeklenmesinde rol alan γ-tübülin halka kompleksini oluşturur.
9. Ara filamanlar kültürdeki hücrelerin büyümesi için gerekli değildir, dolayısıyla vimentine karşı kullanılan siRNA hiçbir etki göstermez.
10. Hücre iskeleti ara filamanlarının dimerleri çakışmayacak şekilde kaymış paralel olmayan bir şekilde tetramerleri oluşturmak için birleşirler. Bu tetramerlerin daha sonra uç uca bağlanması profilamanları oluşturur. Ara filamanlar, paralel olmayan tetramerlerden oluştukları için farklı uçlara sahip değildir ve apolardır.
11. Neksin, mikrotübül ikililerini sillerde birbirine bağlayarak tekli mikrotübüllerin kaymasını kirpiklerin hareketiyle sonuçlanan bir esneme hareketine dönüştürür. Eğer ortadan kaldırılırsa mikrotübüller birbiri üzerinde kayardı.

Bölüm 14

1. Periferal zar proteinleri, yoğun tuz içeren bir yıkama ya da fosfolipid çift tabaka yapısını bozmayan yüksek pH'lı solüsyonlarla plazma zarından uzaklaştırılabilinir. İntegral membran proteinleri, sadece fosfolipid çift tabaka yapısını parçalayan deterjanlar ile zardan ayrıştırılabilir.
2. Frye ve Edidin, fare ve insan hücrelerini birleştirip sonrasında farklı floresan boyaları ile etiketlenmiş

anti-fare ve anti-insan antikorları kullanarak zar proteinlerinin dağılmasını incelemişlerdir. 37°C'de kısa süreli bir inkübasyondan sonra proteinler birbirleriyle karışmış ve akışkan membran içinde lateral olarak dağılabildiklerini göstermiştir. Eğer proteinler 2°C'de inkübe edilmiş olsaydı, zar bu sıcaklıkta akışkan olmadığından proteinler birbirinden ayrı kalacaktı.

3. Lipid yığınları, kolesterol ve sfingolipidlerce zengin olan ayrık zar alanlarıdır. Lipid yığınlarının, hücre hareketi, endositoz ve hücre sinyal iletiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

4. Hücre iskeleti ile ilişkili olan transmembran proteinleri, lipid çift tabaka yapısında serbestçe hareket edemezler. Kendi hareketlerinin kısıtlanmasına ek olarak, hücre iskeletine bağlı olan bu transmembran proteinleri diğer zar proteinlerinin hareketliliğini kısıtlayabilir.

5. C_o/C_i=10 olacak şekilde, K^+ denge potansiyeli Nernst denklemi üzerinden -59mV olarak hesaplanır. Gerçek dinlenme zar potansiyeli K^+ denge potansiyelinden farklıdır çünkü dinlenmede olan kalamar aksonları, K^+ iyonlarına diğer iyonlardan daha geçirgendir.

6. Kas hücrelerinde zar depolarizasyonunun gerçekleşmesi için nikotinik asetilkolin reseptörlerinin açılması gereklidir. Kürar, asetilkoline yanıt olarak kas hücrelerinin kasılmasını engeller.

7. K^+ kanalı, karbonil oksijen atomlarıyla kaplı seçicilik filtresi içerir. Bu por, ancak karbonil oksijen atomları ile birleşmesinin sonucu olarak bütün su moleküllerinin uzaklaştığı dehidrate K^+ iyonlarının geçişini sağlayacak genişliktedir. Sulu Na^+ iyonları karbonil oksijen atomları ile etkileşime geçemeyecek kadar küçüktür ve su molekülleri ile bağlı kalırlar. Bu kompleks kanal porundan geçebilmek için çok büyüktür.

8. Konsantrasyon gradientine karşı glikozun hücre içerisine alınımı, Na^+ iyonlarının taşınması ile enerji açısından pozitif yönde gerçekleşir.

9. *mdr* geni, kanser hücrelerinde sıklıkla yüksek seviyede ifade edilen bir ABC transportörü kodlar. Bu transportör, çeşitli ilaçları tanıyabilir ve bunları hücre dışına pompalayarak kemoterapötik ilaçlara karşı direnç sağlar.

10. İşaretlenmemiş LDL'nin fazladan eklenmesi normal hücrelerin yüzeyine işaretlenmiş LDL'nin bağlanmasını azaltır. Bu durum işaretlenmiş ve işaretlenmemiş LDL'nin, normal hücre yüzeylerinde sınırlı sayıda bulunan özgül bağlanma bölgelerine karşı yarış içerisinde olduklarını gösterir.

11. AH'li hastalarda, LDL reseptöründe LDL alımının yetersizliği ile sonuçlanan iki farklı mutasyon tanımlanmıştır. AH'li hastaların çoğundan elde edilen hücreler LDL bağlayamaz ki bu LDL alınımı için özgül bir reseptörün gerekli olduğunu gösterir. Diğer mutant reseptörler LDL'yi bağlayabilir fakat kaplı çukurcuklarda kümelenemez. Bu da kaplı çukurcukların reseptör aracılı endositozdaki rolünü gösterir.

12. Fagositoz, plazma zarının aktin merkezli genişlemesini gerektirir. Buna bağlı olarak fagositoz, aktin polimerizasyonunun inhibisyonu ile engellenir. Klatrin aracılı endositoz aktinden bağımsızdır ve bu durumdan etkilenmeyecektir.

Bölüm 15

1. Gram-pozitif bakteriler, hücre duvarı ile çevrili tek bir zar –plazma zarı– içerir. Gram-negatif bakteriler, ince bir hücre duvarı ile ayrılmış bir plazma zarına ve bir dış zara sahiptir.

2. Bakteriyel hücre iskeleti proteinleri hücre duvarı sentezini kontrol ederek hücre şeklini belirler.

3. Sert bitki hücre duvarı hücrenin şişmesini engeller ve turgor basıncının artmasına izin verir.

4. Hemiselülozlar dallanmış polisakkaridler olup selüloz mikrolifçiklerinin yüzeyine hidrojen bağı ile bağlanır. Bu etkileşim selüloz mikrolifçikleri sert liflere dönüştürür.

5. Bu glukoz taşıyıcılarının doğru yerleşmesi, bağırsak epitel hücrelerinin glukozun barsak lümeninden kana taşınmasında görülen polarize olmuş foksiyonu için gereklidir. Sıkı bağlantılar bu taşıyıcıların plazma zarının bölümleri arasında difüzyonunu engeller ve epitel hücreleri arasındaki boşlukları kapatır.

6. Hidroksilizin, kollajen üçlü sarmalını polipeptid zincirleri arasında hidrojen bağları oluşturarak kararlı hale getirir. Dolayısıyla lizilhidroksilazın engellenmesi kollajen iplikçiklerinin kararlılığını düşürürdü.

7. Fibril-oluşturan kollajenler prokollajen olarak bilinen çözünebilir öncülerden sentezlenir. Prokollajenler uçlarında helezonik olmayan parçalara sahiptir, bu parçalar fibrillerin birleşmesini engeller. Yalnızca prokollajenin hücre dışına salgılanmasından sonra helezonik olmayan parçalar çıkarılır ve fibriller birleştirilir.

8. GAG'lar, sülfat gruplarının eklenmesiyle değiştirilen asidik şeker molekülleri içerir. Bu durum GAG'lara yüksek negatif yük katarak pozitif yüklü iyonlara bağlanmalarına ve su moleküllerini tutarak sulu jeller oluşturmalarına neden olur.

9. Peptid büyük olasılıkla sıkı bağlantıları bozarak taşıyıcının plazma zarının apical ve bazolateral bölümleri arasında serbest difüzyonuna izin verir.

10. E-kadherinler epitel hücrelerinin seçici adhezyonuna aracılık ettiklerinden, dominant negative formun yüksek oranda eksprese edilmesi komşu hücrelerin

etkileşimlerini bozardı.

11. $\alpha_6\beta_4$ integrinin sitoplazmik kısmı, integrinin ara filaman hücre iskeleti ile plektin aracılığıyla etkileşimi için gereklidir. Dolayısıyla mutasyon hemidezmozom oluşumunu bozarak hücre-matriks etkileşiminin düşmesine neden olurdu.

12. Elektriksel sinapslar sinir hücrelerinde bulunan özelleşmiş aralık bağlantılarıdır. Bunlar, hücreler arasında iyonların hızlı geçişine izin vererek sinir impulslarının iletimini sağlar.

13. Aralık bağlantıları ve plazmodesmata, bitişik hücrelerin sitoplazmaları arasında kanallar oluşturmaları açısından benzerdir. Hayvanlarda ve bitkilerde analog yapılar olmaları homolog olmalarından daha olasıdır çünkü yapıları birbirinden son derece farklıdır.

Bölüm 16

1. Parakrin sinyal iletiminde, bir ya da birkaç hücreden salınan moleküller yakındaki hücreleri etkiler. Endokrin sinyal iletiminde ise, hormonlar vücut boyunca taşınıp hormon için reseptörü olan herhangi bir hedef hücrede rol oynar.

2. Hidrofobik moleküller, steroid hormonlar gibi, plazma zarı boyunca yayılabilir ve sitozolik ya da nükleer reseptörlere bağlanabilir. Hidrofilik moleküller (peptid hormonlar gibi) ise plazma zarını geçemedikleri için hücre yüzeyi üzerindeki reseptörlerine bağlanarak işlev görür.

3. Aspirin, araşidonik asitten prostaglandin ve tromboksan sentezinde ilk aşamayı katalizleyen siklooksigenaz enzimini inhibe eder.

4. cAMP fosfodiesterazın inhibisyonu, hücre çoğalmasını uyaran cAMP düzeylerinin yükselmesine neden olurdu.

5. Rekombinant molekül, G_i ile eşlenik bir epinefrin reseptörü gibi davranırdı. Epinefrin böylece adenilil siklazı inhibe edip hücre cAMP düzeylerini düşürürdü. Asetilkolinin, rekombinant reseptöre bağlanamayacağı için bir etkisi olmazdı.

6. Protein fosfataz 1, protein kinaz A tarafından fosforillenen serin kalıntılarını ayırır. Siklik AMP-indüklenebilir genler, protein kinaz A tarafından fosforillenen CREB tarafından aktive edilir ve böylece protein fosfataz 1'in yüksek düzeyde ekspresyonu bu genlerin indüksiyonunu engellerdi. Ancak, protein fosfataz 1 cAMP-kapılı ligand kanallarının aktivitesini etkilemezdi çünkü bu kanallar protein fosforillenmesi ile değil doğrudan cAMP bağlanması ile açılır.

7. PDGF monomerleri reseptör dimerleşmesini indüklemezdi. Çünkü bu reseptör tirozin kinazlardan sinyal iletiminde ilk önemli aşama olup PDGF reseptörünü uyarmayı gerçekleştiremezdi.

8. Eksik olan reseptör bir dominant negative mutant gibi davranırdı çünkü normal reseptör ile dimerleşirdi. Bu dimerler, çapraz fosforillenme yapamayacağından inaktif olurdu.

9. JAK'lar, sitokin sinyal iletimine yanıt olarak STAT'ları fosforiller ve aktive ederdi. Dominant negative JAK ekspresyonu ise STAT aktivasyonunu inhibe eder ve gen indüksiyonunu engellerdi.

10. Bir GEF Ras aktivasyonu için gereklidir ve dolayısıyla GEF'e karşı olan siRNA acil-erken gen indüksiyonunu inhibe ederdi.

11. Akt, translasyon faktörü eIF2B'yi düzenleyen protein kinaz GSK-3'ü fosforiller. Ayrıca Akt, S6 kinazı ve eIF4E bağlayan protein 4E-BP1'i fosforilleyerek translasyonu düzenleyen mTOR protein kinazı düzenler.

12. Bu mutasyon, büyük olasılıkla, β-katenin üzerindeki bir übikitinlenme bölgesini değiştirerek β-kateninin stabilizasyonuna ve nükleer birikimine neden olur. Nükleusta β-katenin Tcf transkripsiyon faktörleri ile bir kompleks oluşturarak gen ekspresyonunu uyarır.

Bölüm 17

1. G_0 ve G_1 hücrelerinin her ikisi de aynı miktarda DNA ($2n$) içerirler ve metabolik olarak aktiftirler. Farklı oldukları nokta, G_0 hücrelerin duraksatılmış halde bulunmaları ve tekrar uyarılmadıkça hücre döngüsüne girip çoğalmamalarıdır.

2. G_1 ve S evresi kontrol noktalarında hücre döngüsünün durdurulması, hasara uğramış DNA'nın kopyalanmadan önce tamir edilmesi için zaman verir. G_2 kontrol noktasındaki duraksama ise, DNA kırıkları gibi hasarın mitoz bölünmeden önce tamir edilmesi için süre verir, böylece hasara uğramış DNA'nın kardeş hücrelere aktarılmasını engeller.

3. Cdk'ler dört farklı mekanizma ile regüle edilirler: siklinlere bağlanmaları, aktive edici fosforilasyonlar, inhibitör fosforilasyonlar, ve Cdk inhibitörlerine bağlanmaları.

4. Yavru hücrelerden biri yanlış dizilmiş kromozomların her iki kopyasını da alırken, diğer yavru hücre hiçbirini alamaz.

5. Cdk7/siklin H kompleksi bir Cdk aktive edici kinaz olduğu gibi, RNA polimeraz ile transkripsiyon için de gereklidir. Bu nedenle Cdk7'nin inhibe edilmesi hücre döngüsünün duraksamasına ve transkripsiyonun

indüklemezdi. Çünkü b
sinyal iletiminde ilk öne
reseptörünü uyarmayı g

8. Eksik olan reseptör bir d
davranırdı çünkü normal
dimerler, çapraz fosforill
inaktif olurdu.

9. JAK'lar, sitokin sinyal
STAT'ları fosforiller ve
Dominant negative JAI
aktivasyonunu inhibe e
engellerdi.

10. Bir GEF Ras aktivasyon
dolayısıyla GEF'e karşı
indüksiyonunu inhibe ed

11. Akt, translasyon faktör
protein kinaz GSK-3'ü
S6 kinazı ve eIF4E bağ
fosforilleyerek translasy
protein kinazı düzenler.

12. Bu mutasyon, büyük ola
üzerindeki bir übikitinle
değiştirerek β-kateninin
ve nükleer birikimine ne
β-katenin Tcf transkripsi
kompleks oluşturarak ge

Bölüm 17

1. G_0 ve G_1 hücrelerinin her il
($2n$) içerirler ve metabolik
oldukları nokta, G_0 hücrele
bulunmaları ve tekrar uyar
girip çoğalmamalarıdır.

2. G_1 ve S evresi kontrol nokt
döngüsünün durdurulması,
kopyalanmadan önce tamir
G_2 kontrol noktasındaki du
gibi hasarın mitoz bölünme
için süre verir, böylece hasa
hücrelere aktarılmasını eng

3. Cdk'ler dört farklı mekaniz
siklinlere bağlanmaları, akti
inhibitör fosforilasyonlar, v
bağlanmaları.

4. Yavru hücrelerden biri yanl
her iki kopyasını da alırken
alamaz.

5. Cdk7/siklin H kompleksi bi
olduğu gibi, RNA polimera
de gereklidir. Bu nedenle Cd
hücre döngüsünün duraksam

ktır.

nın normalden fazla
üsününün ilerlesini G_1
noktasında durduracaktır. Rb
D kompleksle rinin temel hedefi
Rb proteinleri içermeyen
rotein düzeyindeki artıştan

rlanması nükleer zarfın yıkımı
afından fosforlanamayan
esyonu nükleer zarfın
ktir.

i, farklı yapısal proteinleri
erinin değişmesini sağlar ve
arasında kondensinler, nükleer
proteinleri ve mikrotübül-
Cdk1/siklin B bunlara ek olarak,
protein kinazları aktive eder.

de başlayacaktır. Ancak, Cdk1/
ktif olarak kalacak, dolayısıyla,
den oluşması, kromozomların
sitokinez gerçekleşmeyecektir.

leks/siklozom (APC/C)
ak, separaz isimli proteazın
Aktive olan separaz,
atarak, kardeş kromatidleri bir
ılmasını sağlar.

etafaz II evresinde duraklaması

ili bir şekilde fagositoz ile
lır. Nekroz ile ölen hücreler
arası matrikse salar ve
ur.

ekslerde (örn., apopitozom)
teolitik bölünme ile aktif
n aktif olmayan öncüller olarak
larak, kaspazlar ile ilişkili olan
inhibe eden hücreler IAP'lar
içerir.

inlerin kaspazlar tarafından
çalanması için gereklidir.
minler kaspazlar tarafından
bu mutant oluşum nükleus
geller.

apoptotik proteinler kaspaz
len mitokondriden sitokrom
arak, apoptozu uyarırlar.
proteinlerin aktivitesi, Bcl-
ptotik sadece-BH3 üyeleri

5. DNA hasarına yanıt olarak p53 aktivasyonu, CDK baskılayıcı p21 gibi ayrıca Bcl-2 ailesinin sadece-BH3 üyelerinden PUMA ve Noxa gibi genlerin ifadesine yol açar. p21 hücre döngüsünün duraksamasına sebep olur ve sadece-BH3 Bcl-2 aile üyeleri apoptozu uyarır.

6. Mutant 14-3-3 proteini Bad'ı inaktif durumda tutamayacağından, Bad apoptozu uyarmak için harekete geçecektir.

7. 14-3-3 proteinleri Bad ve Foxo gibi proapoptotik proteinleri toplayarak onları etkisiz bir durumda tutar. 14-3-3 proteinlerine karşı siRNA uygulanan hücrelerde bu nedenle apoptoz oranı artmış olacaktır.

8. Ced-3 *C. elegans* taki tek kaspazdır. Onun mutasyona uğraması durumunda gelişim sırasında apoptoz ile ölmesi gereken tüm hücreler yaşayacaktır. Ced-3'e karşı uygulanan siRNA'da aynı etkiye sahip olacaktır.

9. Bu dokular, çoğalma ve farklılaşmış hücrelerin yerini alabilme yeteneğini koruyan kök hücreleri içerir.

10. Kök hücrelerin en önemli özelliği kendini yenileme yetenekleridir. Onlar bölündüğünde biri kök hücre olarak kalan, diğeri bölünerek farklılaşacak olan iki yavru hücre oluşur.

11. Embriyo kök hücreleri daha kolay izole edilir ve kültürlenir, ayrıca yetişkin bir organizmada farklılaşmış hücre türlerinin hepsine dönüşebilme yeteneğine sahiptirler.

12. Uyarılmış pluripotent kök hücreleri, embriyolardan türetilmesine gerek kalmadan doğrudan yetişkin somatik hücre elde edilebilir.

Bölüm 19

1. Salim tümör oluştuğu bölgede sınırlı kalır, buna karşılık malin tümör çevre dokuya yayılır ve vücudun başka bölümlerine metastaz yapar.

2. Tümör ilerledikçe tümör topluluğunu oluşturan hücrelerde mutasyonlar gerçekleşir. Bu mutasyonlardan bazıları içinde gerçekleştikleri hücreye seçici çoğalma avantajı sağlayarak bu hücrelerin daha fazla çoğalmasına neden olur. Klonal seçilim adı verilen bu olay giderek daha hızlı çoğalan ve daha malin nitelikler kazanan tümörlerin gelişmesiyle sonuçlanır.

3. Östrojenler meme ve endometrium hücreleri gibi, bu hormona cevap veren hücrelerin çoğalmasını uyaran tümör kamçılayıcılar olarak davranır.

4. Otokrin çoğalma uyarımı tümör hücresinin kendi çoğalmasını uyaran büyüme faktörlerini ürettiği pozitif bir geri besleme sistemidir.

5. Kanser hücrelerinin tutunma yeteneği normal hücrelerden daha düşük, hücre-hücre ve hücre-matriks

etkileşimlerini bozardı.

11. $\alpha_6\beta_4$ integrinin sitoplazmik kısmı, integrinin ara filaman hücre iskeleti ile plektin aracılığıyla etkileşimi için gereklidir. Dolayısıyla mutasyon hemidezmozom oluşumunu bozarak hücre-matriks etkileşiminin düşmesine neden olurdu.

12. Elektriksel sinapslar sinir hücrelerinde bulunan özelleşmiş aralık bağlantılarıdır. Bunlar, hücreler arasında iyonların hızlı geçişine izin vererek sinir impulslarının iletimini sağlar.

13. Aralık bağlantıları ve plazmodesmata, bitişik hücrelerin sitoplazmaları arasında kanallar oluşturmaları açısından benzerdir. Hayvanlarda ve bitkilerde analog yapılar olmaları homolog olmalarından daha olasıdır çünkü yapıları birbirinden son derece farklıdır.

Bölüm 16

1. Parakrin sinyal iletiminde, bir ya da birkaç hücreden salınan moleküller yakındaki hücreleri etkiler. Endokrin sinyal iletiminde ise, hormonlar vücut boyunca taşınıp hormon için reseptörü olan herhangi bir hedef hücrede rol oynar.

2. Hidrofobik moleküller, steroid hormonlar gibi, plazma zarı boyunca yayılabilir ve sitozolik ya da nükleer reseptörlere bağlanabilir. Hidrofilik moleküller (peptid hormonlar gibi) ise plazma zarını geçemedikleri için hücre yüzeyi üzerindeki reseptörlerine bağlanarak işlev görür.

3. Aspirin, araşidonik asitten prostaglandin ve tromboksan sentezinde ilk aşamayı katalizleyen siklooksigenaz enzimini inhibe eder.

4. cAMP fosfodiesterazın inhibisyonu, hücre çoğalmasını uyaran cAMP düzeylerinin yükselmesine neden olurdu.

5. Rekombinant molekül, G_i ile eşlenik bir epinefrin reseptörü gibi davranırdı. Epinefrin böylece adenilil siklazı inhibe edip hücre cAMP düzeylerini düşürürdü. Asetilkolinin, rekombinant reseptöre bağlanamayacağı için bir etkisi olmazdı.

6. Protein fosfataz 1, protein kinaz A tarafından fosforillenen serin kalıntılarını ayırır. Siklik AMP-indüklenebilir genler, protein kinaz A tarafından fosforillenen CREB tarafından aktive edilir ve böylece protein fosfataz 1'in yüksek düzeyde ekspresyonu bu genlerin indüksiyonunu engellerdi. Ancak, protein fosfataz 1 cAMP-kapılı ligand kanallarının aktivitesini etkilemezdi çünkü bu kanallar protein fosforillenmesi ile değil doğrudan cAMP bağlanması ile açılır.

7. PDGF monomerleri reseptör dimerleşmesini indüklemezdi. Çünkü bu reseptör tirozin kinazlardan sinyal iletiminde ilk önemli aşama olup PDGF reseptörünü uyarmayı gerçekleştiremezdi.

8. Eksik olan reseptör bir dominant negative mutant gibi davranırdı çünkü normal reseptör ile dimerleşirdi. Bu dimerler, çapraz fosforillenme yapamayacağından inaktif olurdu.

9. JAK'lar, sitokin sinyal iletimine yanıt olarak STAT'ları fosforiller ve aktive ederdi. Dominant negative JAK ekspresyonu ise STAT aktivasyonunu inhibe eder ve gen indüksiyonunu engellerdi.

10. Bir GEF Ras aktivasyonu için gereklidir ve dolayısıyla GEF'e karşı olan siRNA acil-erken gen indüksiyonunu inhibe ederdi.

11. Akt, translasyon faktörü eIF2B'yi düzenleyen protein kinaz GSK-3'ü fosforiller. Ayrıca Akt, S6 kinazı ve eIF4E bağlayan protein 4E-BP1'i fosforilleyerek translasyonu düzenleyen mTOR protein kinazı düzenler.

12. Bu mutasyon, büyük olasılıkla, β-katenin üzerindeki bir übikitinlenme bölgesini değiştirerek β-kateninin stabilizasyonuna ve nükleer birikimine neden olur. Nükleusta β-katenin Tcf transkripsiyon faktörleri ile bir kompleks oluşturarak gen ekspresyonunu uyarır.

Bölüm 17

1. G_0 ve G_1 hücrelerinin her ikisi de aynı miktarda DNA ($2n$) içerirler ve metabolik olarak aktiftirler. Farklı oldukları nokta, G_0 hücrelerin duraksatılmış halde bulunmaları ve tekrar uyarılmadıkça hücre döngüsüne girip çoğalmamalarıdır.

2. G_1 ve S evresi kontrol noktalarında hücre döngüsünün durdurulması, hasara uğramış DNA'nın kopyalanmadan önce tamir edilmesi için zaman verir. G_2 kontrol noktasındaki duraksama ise, DNA kırıkları gibi hasarın mitoz bölünmeden önce tamir edilmesi için süre verir, böylece hasara uğramış DNA'nın kardeş hücrelere aktarılmasını engeller.

3. Cdk'ler dört farklı mekanizma ile regüle edilirler: siklinlere bağlanmaları, aktive edici fosforilasyonlar, inhibitör fosforilasyonlar, ve Cdk inhibitörlerine bağlanmaları.

4. Yavru hücrelerden biri yanlış dizilmiş kromozomların her iki kopyasını da alırken, diğer yavru hücre hiçbirini alamaz.

5. Cdk7/siklin H kompleksi bir Cdk aktive edici kinaz olduğu gibi, RNA polimeraz ile transkripsiyon için de gereklidir. Bu nedenle Cdk7'nin inhibe edilmesi hücre döngüsünün duraksamasına ve transkripsiyonun

inhibisyonuna yol açacaktır.

6. Normal bir hücrede p16'nın normalden fazla ekspresyonu, hücre döngüsününün ilerlesini G_1 evresindeki restriksiyon noktasında durduracaktır. Rb proteini, Cdk4, 6/siklin D komplekslerinin temel hedefi olduğu için, fonksiyonel Rb proteinleri içermeyen bir tümör hücresi, p16 protein düzeyindeki artıştan etkilenmeyecektir.
7. Nükleer laminlerin fosforlanması nükleer zarfın yıkımı için gereklidir. Cdk1 tarafından fosforlanamayan mutant laminlerin ekspresyonu nükleer zarfın yıkılmasını engelleyecektir.
8. Cdk1/siklin B kompleksi, farklı yapısal proteinleri fosforile ederek özelliklerinin değişmesini sağlar ve mitozu tetikler. Bunların arasında kondensinler, nükleer laminler, Golgi matriksi proteinleri ve mikrotübül-ilişkili proteinler gelir. Cdk1/siklin B bunlara ek olarak, Aurora ve Polo-benzeri protein kinazları aktive eder.
9. Anafaz normal bir şekilde başlayacaktır. Ancak, Cdk1/siklin B kompleksleri aktif olarak kalacak, dolayısıyla, hücre çekirdeğinin yeniden oluşması, kromozomların dekondanse olmaları ve sitokinez gerçekleşmeyecektir.
10. Anafaza-ilerleten kompleks/siklozom (APC/C) sekürini yıkıma uğratarak, separaz isimli proteazın aktivasyonuna yol açar. Aktive olan separaz, kohezinleri yıkıma uğratarak, kardeş kromatidleri bir arada tutan bağların kırılmasını sağlar.
11. Bu farelerin oositleri metafaz II evresinde duraklaması gerçekleşmeyecektir.

Bölüm 18

1. Apoptotik hücreler etkili bir şekilde fagositoz ile dokulardan uzaklaştırılır. Nekroz ile ölen hücreler ise çeriklerini hücreler arası matrikse salar ve inflamasyona neden olur.
2. Kaspazlar bazı komplekslerde (örn., apopitozom) aktifleştirilen veya proteolitik bölünme ile aktif enzimlere dönüştürülen aktif olmayan öncüller olarak sentezlenir. Buna ek olarak, kaspazlar ile ilişkili olan ve onların aktivitesini inhibe eden hücreler IAP'lar (apoptoz inhibitörleri) içerir.
3. Apoptoz sırasında laminlerin kaspazlar tarafından kesilmesi nükleus parçalanması için gereklidir. Mutasyona uğramış laminler kaspazlar tarafından kesilemeyeceğinden, bu mutant oluşum nükleus fragmentasyonunu engeller.
4. Bcl-2 ailesine ait proapoptotik proteinler kaspaz aktivasyonu teşvik eden mitokondriden sitokrom *c* salınımına neden olarak, apoptozu uyarırlar. Proapoptotik işlemci proteinlerin aktivitesi, Bcl-2 ailesine ait antiapoptotik sadece-BH3 üyeleri tarafından düzenlenir.
5. DNA hasarına yanıt olarak p53 aktivasyonu, CDK baskılayıcı p21 gibi ayrıca Bcl-2 ailesinin sadece-BH3 üyelerinden PUMA ve Noxa gibi genlerin ifadesine yol açar. p21 hücre döngüsünün duraksamasına sebep olur ve sadece-BH3 Bcl-2 aile üyeleri apoptozu uyarır.
6. Mutant 14-3-3 proteini Bad'ı inaktif durumda tutamayacağından, Bad apoptozu uyarmak için harekete geçecektir.
7. 14-3-3 proteinleri Bad ve Foxo gibi proapoptotik proteinleri toplayarak onları etkisiz bir durumda tutar. 14-3-3 proteinlerine karşı siRNA uygulanan hücrelerde bu nedenle apoptoz oranı artmış olacaktır.
8. Ced-3 *C. elegans* taki tek kaspazdır. Onun mutasyona uğraması durumunda gelişim sırasında apoptoz ile ölmesi gereken tüm hücreler yaşayacaktır. Ced-3'e karşı uygulanan siRNA'da aynı etkiye sahip olacaktır.
9. Bu dokular, çoğalma ve farklılaşmış hücrelerin yerini alabilme yeteneğini koruyan kök hücreleri içerir.
10. Kök hücrelerin en önemli özelliği kendini yenileme yetenekleridir. Onlar bölündüğünde biri kök hücre olarak kalan, diğeri bölünerek farklılaşacak olan iki yavru hücre oluşur.
11. Embriyo kök hücreleri daha kolay izole edilir ve kültürlenir, ayrıca yetişkin bir organizmada farklılaşmış hücre türlerinin hepsine dönüşebilme yeteneğine sahiptirler.
12. Uyarılmış pluripotent kök hücreleri, embriyolardan türetilmesine gerek kalmadan doğrudan yetişkin somatik hücre elde edilebilir.

Bölüm 19

1. Salim tümör oluştuğu bölgede sınırlı kalır, buna karşılık malin tümör çevre dokuya yayılır ve vücudun başka bölümlerine metastaz yapar.
2. Tümör ilerledikçe tümör topluluğunu oluşturan hücrelerde mutasyonlar gerçekleşir. Bu mutasyonlardan bazıları içinde gerçekleştikleri hücreye seçici çoğalma avantajı sağlayarak bu hücrelerin daha fazla çoğalmasına neden olur. Klonal seçilim adı verilen bu olay giderek daha hızlı çoğalan ve daha malin nitelikler kazanan tümörlerin gelişmesiyle sonuçlanır.
3. Östrojenler meme ve endometrium hücreleri gibi, bu hormona cevap veren hücrelerin çoğalmasını uyaran tümör kamçılayıcılar olarak davranır.
4. Otokrin çoğalma uyarımı tümör hücresinin kendi çoğalmasını uyaran büyüme faktörlerini ürettiği pozitif bir geri besleme sistemidir.
5. Kanser hücrelerinin tutunma yeteneği normal hücrelerden daha düşük, hücre-hücre ve hücre-matriks

etkileşimi de daha düzensizdir. Kanser hücreleri, ek olarak, hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayan ve komşu dokulara yayılmayı sağlayan proteazlar salgılar. Son olarak, kanser hücreleri yeni kan damarlarının oluşumunu uyaran anjiogenik faktörler salgılar.Tümöre oksijen ve besin maddelerinin ulaşmasını sağlayan bu damarlar aynı zamanda kanser hücrelerinin dolaşıma kolayca geçmesine olanak verdiğinden metastazı kolaylaştırır.

6. AIDS hastalarında immün sistem baskılandığından bu kişiler onkojenik virüs enfeksiyonlarına karşı duyarlıdır.

7. Protoonkogenler ya normalden çok daha fazla miktarda ya da olmaması gereken hücre tiplerinde eksprese olurlar. Bu ekspresyon değişiklikleri sentezlenen proteinin yapısında bir değişiklik olmadığı halde protoonkogeni onkogene dönüştürebilir. Bir protoonkogen bu şekilde kendisini aktif bir promotörün etkisinde kalmasına neden olan bir translokasyon ya da gen amplifikasyonu sonucunda aktifleşebilir.

8. *INK4* geni Cdk 4,6/siklin D kompleksini inhibe eden Cdk inhibitörü p16'yı kodlar. Cdk 4,6/siklin D kompleksinin hedefi Rb olduğundan p16'nın aşırı ekspresyonu Rb'nin inaktif olduğu hücreleri etkileyemez.

9. p53 iyonlaştırıcı radyasyon sonucu ortaya çıkan DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünün baskılanması ve apoptozis için gereklidir. Bu yüzden p53 geni normal olan hücreler radyasyona daha duyarlıdır.

10. Imatinib kronik miyeloid lösemi hücrelerinde eksprese olan Bcr/Abl tirozin kinazın spesifik inhibitörüdür. Bcr/Abl'nin inhibisyonu tümör hücrelerinin çoğalmasını durdurur. Imatinib direnci çoğunlukla Bcr/Abl'de gerçekleşen ve ilacın bağlanmasını engelleyen mutasyonlardan kaynaklanır.

11. Tümör hücrelerinin çoğalmasının ve sağ kalımının aktifleşen onkogenlere bağımlı olduğu ve diğer sinyal yolaklarının ikincil önem taşıdığı düşünülmektedir. Tümör hücrelerinin aktifleşen onkogenlere bu şekilde bağımlı olması onkogen bağımlılığı olarak adlandırılır. Bu durum aktif onkogene karşı geliştirilen ilaçların seçici olarak tümör hücrelerini hedef alırken normal hücrelerin başka sinyal yolaklarını kullanarak varlıklarını sürdürebileceğine işaret etmektedir.

12. Olmaz. MEK sinyal yolağında Raf'ın aşağısında yer alır. Bu yüzden MEK inhibe edildiğinde Raf'da gerçekleşen onkogenik aktifleşme etkili olmaz.

Sözlük

A

α sarmal Bir polipeptid zincirinin amino asitleri arasında, dört amino asitte bir kurulan hidrojen bağlarının oluşturduğu kıvrımlı sekonder yapı.

α-aktinin Aktine bağlanan ve aktin filamanlarını birbirine bağlayıp, kasılan demetler oluşumunu sağlayan bir protein.

ABC taşıyıcısı Yüksek oranda korunmuş ATP bağlama bölgesi ile tanımlanan, geniş, zar taşınım protein ailesinin bir üyesidir.

abl Bir protein-tirozin kinaz kodlayan ve kronik miyeloid lösemide kromozom translokasyonu ile aktive olan bir proto-onkogen.

absisik asit Bir bitki hormonu.

acil-erken gen Büyüme faktörü uyarısına yanıt olarak transkripsiyonu hızla indüklenen bir gen.

açık okuma çerçevesi Dur kodonu içermeyen ve bir polipeptid kodlayabilen bir nükleotid dizisi.

adenilil siklaz ATP'den siklik AMP oluşumunu katalizleyen enzim.

adenin Timin ya da urasil ile eşleşen bir pürin.

adenom Bez epitelinden köken alan bir selim tümör.

adenovirus Yaygın olarak çalışılan bir DNA tümör virüsü.

adenozin-5'-trifosfat (ATP) Bakınız ATP.

ağ Bir hücre içinde etkileşen metabolik veya düzenleyici yolaklar dizini.

akış sitometresi Hücrelerin tek tek floresan yoğunluklarını ölçen cihaz.

akışkan mozaik model Proteinlerin, akışkan fosfolipid çift tabaka içerisine yerleştiği zar yapısı modeli.

aksiyon potansiyeli Aksonlar boyunca ilerleyen sinir impulsları.

aksonem Kirpik (silia) ve kamçının (flagella), ortada bir çift mikrotübül ve çevreleyen dokuz mikrotübül çiftinden oluşan, temel yapısı.

aksonemal dinein Kirpik (silia) ve kamçı (flagella) yapısında bulunan dinein tipi.

Akt PIP_3 tarafından aktive edilen ve hücrenin hayatta kalması sinyalinin iletiminde anahtar rol oynayan bir serin/treonin kinaz.

aktif bölge Bir enzimin, sübstratlara bağlandığı ve bir enzimatik tepkimeyi katalizlediği bölgesi.

aktif taşıma Moleküllerin zardan, olumsuz yönde ve ATP hidrolizi veya diğer bir enerji kaynağının desteğiyle taşınması.

aktin ağı Gevşek, üç boyutlu ağ örgüsü şeklinde birbirine çapraz-bağlanan aktin filamanları.

aktin Bol miktarda bulunan ve hücre iskelet filamanlarını oluşturmak üzere polimerleşen, 43 kd'lik bir protein.

aktin demeti Sıkıca paketlenmiş düzende birbirine çapraz-bağlı aktin filamanları.

aktin-bağlayan protein Aktine bağlanarak, aktin filamanlarının oluşumunu, yıkılımını ve organizasyonunu düzenleyen proteinler.

aktin-demetleyen proteinler Aktin filamanlarını, demet oluşturacak şekilde birbirine çapraz-bağlayan proteinler.

aktivasyon enerjisi Bir molekülü, bir kimyasal tepkimeye girmek üzere, geçiş durumuna çıkarmak için gerekli enerji.

aktivasyonla uyarılan deaminaz (AID) B lenfositlerde eksprese edilen ve immünglobülin genlerinin değişken bölgesindeki DNA'da sitozinleri deamine ederek urasile dönüştüren bir enzim

allel Genin tek kopyası.

allosterik düzenlenme Enzimlerin, aktif bölgesinden farklı bir bölgesine bağlanarak konformasyonunu ve katalitik aktivitesini değiştiren küçük moleküllerle regülasyonu.

alternatif kesip-eldeme (splicing) Pre-mRNA' nın kesilip yeniden birleştirilme paternini değiştirerek farklı mRNA'ların elde edilmesi.

amfipatik Hem hidrofobik hem de hidrofilik bölgelere sahip molekül.

amiloid Yanlış katlanmış proteinin fibroz bir kümesi

amiloplast Nişasta depolayan plastid.

amino asit Bir karboksil grubu, bir amino grubu, bir hidrojen atomu ve bir ayırt edici yan zincirin bir karbon atomuna bağlanmasıyla oluşan, proteinlerin monomerik yapı taşı.

aminoaçil tRNA sentetaz Özgül amino asidi, doğru antikodon dizisine sahip bir tRNA molekülüne bağlayan enzim.

anafaz A Mitoz sırasında, yavru kromozomların, iğin kutuplarına doğru hareketi.

anafaz B Mitoz sırasında, iğ kutuplarının birbirinden ayrılması.

anafaz Kardeş kromatidlerin ayrılıp, iğin zıt kutuplarına doğru hareket ettikleri mitoz evresi.

anafaza-ilerleten kompleks/(Siklozom APC/C) Siklin B ve kohesinlerin yıkımını uyararak, metafazdan anafaza geçişi tetikleyen bir ubikütin ligaz.

anahtar-kilit modeli Sübstratın, enzimin aktif merkezine tam olarak uyduğu enzim etki modeli.
anjiyogenez Yeni kan damarlarının oluşumu.
ankirin Spektrini bağlayarak, aktin hücre iskeletini plazma zarına bağlayan protein.
anlamsız-aracılı mRNA yıkılımı Tam okuma çerçevesi eksik olan mRNA'ların yıkılımı.
antijen Ona karşı bir antikorun yöneltildiği molekül.
antikodon Mesajcı RNA'daki kodon dizisi ile tamamlayıcı baz eşleşmesi yapan, taşıyıcı RNA nükleotid dizisi.
antikor B lenfositler tarafından üretilen ve yabancı bir moleküle bağlanan protein (immunoglobülin olarak da adlandırılır).
antiport Zardan, iki molekülün aksi yönlere doğru taşınması.
antisens nükleik asitler İlgilenilen bir mRNA'ya komplementer olan ve gen ekspresyonunu durdurmak amacıyla kullanılan nükleik asitler (RNA veya DNA).
AP endonükleaz DNA'yı pürinsiz (apürinik) veya pirimidinsiz (apirimidinik) bölgenin yanından kesen DNA onarım enzimi.
apikal bölge Epiteldeki polarize bir hücrenin, görünen serbest yüzeyi.
apoptoz Kromozomal DNA'nın kesilmesi, kromatinin yoğunlaşması ve hem nükleusun hem hücrenin parçalanması ile karakterize, aktif bir programlı hücre ölüm süreci.
apoptozom Mitokondriden sitokrom *c*'nin serbestleşmesini takiben, apoptozu başlatmak üzere kaspaz-9'un, içerisinde aktifleştiği protein kompleks.
aquaporin (su kanal proteinleri) Suyun, içerisinden geçerek plazma zarını hızlıca aşabildiği bir kanal proteini
ara filaman Doku içinde hücrelere mekanik destek sağlayan, yaklaşık 10 nm çapında hücre iskelet filamanları. Ayrıca bkz. keratin ve nörofilaman.
Arabidopsis thaliana Bitki gelişim ve moleküler biyolojisi için bir model olarak kullanılan, küçük bir çiçekli bitki.
aralık bağlantı (gap junction) Komşu hücreler arasında direkt sitoplazmik bağlantı oluşturan plazma membran kanalı.
ardışık kütle spektrometresi (tandem mass spectrometry) Bir peptidin amino asid dizisini belirlemek için ardışık kütle spektrometresinin kullanıldığı bir yöntem.
arkebakteriler İki ana prokaryot grubundan biri; archeabakterilerin birçok türü, ilkel yer kürede geçerli olanlara benzeyen aşırı koşullarda yaşarlar.
armadillo protein ailesi Kararlı hücre kavşaklarında, kaderinleri hücre iskeletine bağlayan, β-katenini içeren bir protein ailesi.
Arp2/3 kompleksi Aktin flamanlarına bağlanarak dallanmayı başlatan bir protein kompleks.
aterens bağlantı Aktin hücre iskeletinin plazma zarına sıkıca bağlandığı, hücre-hücre adezyon bölgesi.
ATM Hasarlı DNA'yı tanıyan ve hücre döngüsünün durmasına yol açan bir protein kinaz.
ATP (adenozin 5'-trifosfat) Hücrede serbest enerjinin depolanması için kullanılan, adenin-içeren bir nükleosid trifosfat.
ATP sentaz Zarı kat eden ve protonların zardan, enerjetik olarak yeğlenen yönde geçişini ATP senteziyle eş zamanlayan, protein kompleks.
ATR DNA hasarına cevap olarak hücre döngüsünü durduran ATM ilintili bir protein kinaz.
Aurora kinaz Mitotik iğ oluşumu, kinotokor fonksiyonu ve sitokinez ile ilişkili bir protein kinaz ailesi.
aydınlık-alan mikroskopisi Işığın doğrudan hücrenin içinden geçtiği, en basit ışık mikroskopi tarzı.
azot fiksasyonu Atmosferik azotun (N), NH_3'a indirgenmesi.

B

β tabakası Bir polipeptid zincirinin, polipeptidin farklı bölgelerinde yerleşik amino asitler arasında hidrojen bağları ile oluşan, tabaka şeklindeki sekonder yapısı.
β-fıçısı β tabakalarının fıçıya benzer bir yapıda katlanmasıyla oluşan bir transmembran domein.
bağlantı kompleksi Bir sıkı bağlantı, bir adheren bağlantı ve bir dezmozomdan oluşan bir hücre-hücre bağlantı bölgesi.
bağlayıcı faktör Transport vezikülleri ile hedef membranları arasındaki ilk etkileşime aracılık eden bir protein.
bakteri En yaygın görülen türleri içeren iki önemli prokaryot grubundan biri.
bakteri yapay kromozomu (BAC) Uzun DNA parçalarının bakterilerde klonlanması amacıyla kullanılan bir vektör tipi.
bakteriyofaj Bir bakteri virüsü.
basit-dizi tekrarları Tekrarlayan DNA dizileri sınıflarından birinin, kısa dizilerin binlerce kopyasının ardışık dizinlerini içeren üyesi.
baskılayıcı/represör Transkripsiyonu baskılayan düzenleyici molekül.
baskın Birden fazla allel bulunması durumunda, organizmanın fenotipini belirleyen allel.
baskın engelleyici mutant Genin normal allelinin fonksiyonunu engelleyen mutant.
başlatma faktörü Translasyonun başlangıç aşamasında fonksiyon gören bir protein.
bazal cisim Aksonemal mikrotübüllerin uzamasını başlatan ve kirpik ve kamçıları hücre yüzeyine sıkıca bağlayan, sentriole benzer bir yapı.
bazal lamina Kas hücrelerini, adipoz hücrelerini ve periferal sinirleri kuşatan ve epitel hücrelere destek olan, tabaka şeklindeki hücre dışı matriks.

baz-çıkararak tamir DNA molekülünden, hasarlı tek bazların çıkartılması şeklindeki DNA tamir mekanizması.
bazolateral bölge Polarize epitel hücresinin, bitişik hücrelerle ya da hücre dışı matriksle temasta olan yüzey alanı.
Bcl-2 Programlanmış hücre ölümünü düzenleyen proteinler ailesinin bir üyesi.
benek(speckle) mRNA kesip-ekleme (splicing) mekanizmasının bileşenlerini içeren nükleer cisim.
benign (selim) tümör Köken aldığı bölgede hapis tutulmuş bir tümör.
birincil yapı Bir polipeptid zincirinde amino asitlerin dizilimi.
bitki hormonu Bitki dokularının çevresel sinyallere yanıtını koordine eden küçük moleküller grubunun bir üyesi.
biyoinformatik Genom dizini gibi, büyük miktardaki biyolojik veriyi analiz etmek için, bilgisayar yöntemlerinin kullanılması.
bölgeye-özgül rekombinasyon Özgül DNA dizilerini tanıyan proteinler aracılığıyla gerçekleşen rekombinasyon.
brasinosteroid Bitki steroid hormonu.
büyüme faktörü Hayvan hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını denetleyen polipeptid.

C

Caenorhabditis elegans Gelişmenin, basit çok hücreli modeli olarak kullanılan bir nematod (yer solucanı).
Cajal cismi snRNA'ların ve diğer RNA-protein komplekslerinin biraraya getirilmesi ile ilişkili çekirdeğe ait bir cisimcik.
Calvin döngüsü Altı CO_2 molekülünün glukoza çevrildiği bir reaksiyonlar dizisi.
CaM kinaz Ca^{2+}/ kalmodulin bağlanmasıyla aktive olan protein kinazlar ailesinin bir üyesi.
cAMP fosfodiesteraz Siklik AMP'yi yıkan enzim.
cAMP-bağımlı protein kinaz Bkz. Protein kinaz A
cAMP-yanıt elemanı (CRE) Hedef genlerin, cAMP'ye transkripsiyonel yanıtını sağlayan bir regülatör dizi.
CCND1 Çeşitli insan kanserlerindeki bir onkogen olan ve siklin D1'i kodlayan gen.
Cdk inhibitörü (CKI) Cdk'lara bağlanarak aktivitelerini baskılayan bir protein ailesi.
Cdk Ökaryotların hücre döngüsünü kontrol eden siklin bağımlı protein kinaz ailesinin bir üyesi.
Cdk1 Ökaryotik hücrelerde mitozun kilit bir düzenleyicisi olan bir serin/treonin kinaz.
cDNA Revers transkriptaz ile *in vitro* sentezlenen, mRNA'ya komplementer olan bir DNA molekülü.
CENP-A Sentrozomda bulunan bir histon H3 varyantı.
cGMP fosfodiesteraz cGMP'yi yıkan enzim.
***cis*-etkili kontrol elemanı** Protein bağlanma bölgesi olarak görev gören ve bitişik genlerin transkripsiyonunu kontrol eden bir düzenleyici DNA dizisi.
Cln START'dan geçişi kontrol eden bir maya siklini (G_1 siklin olarak da bilinir).
c-myc Bir transkripsiyon faktörü kodlayan ve insan tümörlerinde kromozom translokasyonu ya da gen amplifikasyonu ile sıklıkla aktive olan bir proto-onkogen.
COPI ve COPII Vezikülleri kaplayan, klatrin dışında iki protein (COP kaplama proteinini ifade etmektedir).
COPII-kaplı vezikül Endoplazmik retikulumdan Golgi cisimciğine taşımaya aracılık eden COPII kaplı bir transport vezikülü.
COPI-kaplı vezikül Golgi cisimciğinden endoplazmik retikuluma geri alınmaya aracılık eden COPI kaplı bir transport vezikülü.
CREB Siklik AMP yanıtlı eleman-bağlayan protein. Siklik AMP-bağımlı protein kinaz tarafından aktiflenen bir transkripsiyon faktörü.
CRISPR/Cas sistemi Memeli genlerine hedeflenmiş mutasyonların aktarıldığı bir sistem. Sistem belirli hedef dizileri tanıyan CRISPR RNA'ları ve hedef DNA'yı kesen CAS proteinlerini içerir.
CTCF Kromatin organizasyonunun düzenlenmesinde görevli bir tür yapısal protein.

Ç

çapraz iletişim Bir sinyal ileti yolağının, bir diğerinin aktivitesini kontrol ettiği düzenleyici bir mekanizma.
çekinik Baskın allel tarafından maskelenen allel.
çevresel kemer Kasılabilir aktin filaman demetlerinin plazma zarına bağlı olduğu, epitel hücrelerinin etrafındaki kemer benzeri bir yapı.
Çift-iplik kırığı DNA'nın her iki komplementer ipliğinde kırık ile sonuçlanan hasar.
çinko parmak bölgesi Çinko iyonlarını bağlayan sistein ve histidin amino asitlerine sahip halkalardan oluşan, DNA'ya bağlanan bir domein tipi.

D

denetim noktası kinazı DNA hasarına cevap olarak hücre döngüsünü durduran bir protein kinaz (Chk1 veya Chk2).
denge santrifügasyonu Partiküllerin yoğunluklarını temel alarak yoğun bir maddenin gradientinde dengeye gelene kadar santrifüjlenerek ayrıştırılması.
deoksiribonükleik asit (DNA) Hücrenin kalıtım maddesi.
2′-deoksiriboz DNA'da bulunan beş karbonlu bir şeker.
desmin Kas hücrelerinde üretilen bir ara filaman proteini.
dezmoglein Komşu hücrelerin ara filamandan oluşan hücre iskeletlerini dezmozomlarda birbirine bağlayan bir tür transmembran kaderini.

dezmokolin Komşu hücrelerin ara filamandan oluşan hücre iskeletlerini dezmozomlarda birbirine bağlayan bir tür transmembran kaderini.

dezmozom Epitel hücreleri arasında, keratin filamanlarının plazma zarına kenetlendiği bir temas bölgesi, Bkz. Hemidezmozom.

diaçilgliserol PIP_2 hidrolizi ile oluşan ve protein kinaz C'yi aktive eden bir ikincil mesajcı.

dideoksinükleotidler Normal deoksiribozda bulunan 3' hidroksil grubunu içermeyen ve DNA dizinlenmesinde zincir uzamasını durdurma amacıyla kullanılan nükleotidler.

diferansiyel interferens-kontrast mikroskopi Hücrelerin farklı bölümlerinin yoğunluk ve kalınlık değişikliklerini, son görüntüde kontrast farklılığı olarak yansıtan mikroskopi tipi.

diferansiyel santrifügasyon Hücre bileşenlerini, büyüklük ve yoğunluklarına göre ayırmak için kullanılan bir yöntem.

dinamik kararsızlık Mikrotübüllerin uzama ve kısalma döngüleri arasında değişimi.

dinamin Vezikül tomurcuklanmasına katılan, membran ilişkili bir GTPaz.

dinein Mikrotübüller üzerinde eksi uca doğru hareket eden motor protein.

diploid Her kromozomdan iki kopya taşıyan hücre ya da canlı.

diploten Mayoz I'de eş kromozomların, birbirlerinden uzunlamasına ayrıldıkları ancak kiyazmalarla bağlı kaldıkları aşama.

distrofin Kas hücrelerinin hücre iskelet proteini.

diyakinez Kromozomların tamamen yoğunlaştığı ve hücrenin metafaza ilerlediği Mayoz I' de profazın son aşaması.

DNA glikozilaz Bir pürin ya da pirimidini, DNA omurgasını oluşturan deoksiriboza bağlayan bağı kesen bir DNA onarım enzimi.

DNA hasarı denetim noktası Hasarlı DNA'nın replike olmadığını ve yavru hücrelere aktarılmadığını garantileyen hücre döngüsü kontrol noktası.

DNA ligaz DNA ipliğindeki kırıkları yapıştıran bir enzim.

DNA mikrodizin Üzerine yoğun şekilde oligonükleotidler ya da cDNA fragmanları tutturulmuş olan ve floresan probların hibridizasyonu yoluyla, aynı anda binlerce genin analizine imkan sağlayan bir lam ya da zar filtre.

DNA polimeraz DNA sentezini katalizleyen enzim.

DNA transpozon DNA aracılığı ile hareket ederek yer değiştirebilen eleman.

DNA-afinite kromatografisi DNA'ya bağlanan proteinleri, özgül DNA dizinlerine bağlanma özelliklerine dayanarak izole etmek için kullanılan bir yöntem.

DNaz aşırı duyarlı bölge Promotör ve güçlendirici bölgelerin karekteristik özelliği olan, nükleozomdan bağımsız, DNaz ile kesilmeye duyarlı bölge.

dolikol fosfat Endoplazmik retikulumda bulunan ve proteinlerin glikozillenmesi için oligosakkaridlerin üzerinde toplandıkları bir lipid molekülü.

domein Proteinlerde, üçüncül yapının temel birimi olan katlanmış üç boyutlu bölge.

dondurup-çatlatma Örneklerin sıvı nitrojende dondurulduktan sonra, hücre zarının ara yüzeyini ortaya çıkaracak şekilde lipid çift tabakanın ayrılması için çatlatılması esasına dayalı bir elektron mikroskopi yöntemi.

döngüsel (siklik) elektron akışı NADPH sentezlemeden ATP üreten, fotosistem I ile ilişkili bir elektron transport yolağı.

Drosophila melanogaster Hayvan genetiği ve gelişimi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir meyve sineği türü.

düşük-yoğunluklu lipoprotein (LDL) Kolestrolün kanda dolaşımını sağlayan lipoprotein taneciği.

düz endoplazmik retikulum Ökaryotik hücrelerde majör lipid sentez bölgesi.

E

E2F Hücre döngüsü ilerlemesi ile DNA replikasyonunda rol oynayan, genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörleri ailesi.

eikozanoid Otokrin ve parakrin sinyal iletiminde rol alan prostoglandinler, prostosiklinler, tromboksanlar ve lökotrienleri içeren bir yağ sınıfı.

ekdizon Böceklerde metamorfozu tetikleyen bir steroid hormon.

eksinükleaz Bakterilerde, nükleotid kesip-çıkarma onarımı (eksizyon onarımı) sırasında hasarlı DNA'yı kesip çıkaran enzim kompleksi.

eksonükleaz DNA moleküllerini 5' den 3' veya 3' den 5' yönlerinde hidrolize eden enzim.

eksportin Nükleer çıkış sinyallerini tanıyarak, çekirdekten sitozole taşınmayı yönlendiren bir karyoferin.

ekspresyon vektörü Klonlanmış bir DNA'nın konakçı hücre içerisinde ekspresyonunu yönlendiren vektör.

ekzon Bir genin, kesip çıkarma işlemi yapılmış mRNA'daki, bir parçası.

elastik lifler Organlarda, bağ dokusunun hücre dışı matriksinde bulunan ve gerilip tekrar eski şeklini alabilen ipliksi proteinler.

elastin Elastik liflerin esas bileşeni.

elayoplastlar Lipid depolayan plastidler.

elektriksel sinaps Sinir hücreleri arasında iyonların hızlı geçişine olanak sağlayan özelleşmiş aralıklı bağlantının özel bir yapılanması.

elektroforetik harekette değişim analizi Bir proteinin spesifik bir DNA dizisine bağlanma analizi.

elektrokimyasal gradient Bir membranın iki yanında kimyasal konsantrasyon ve elektrik potansiyeli arasındaki fark.

elektron mikroskopi Görüntü oluşturmak için elektron demeti kullanan bir mikroskopi türü. Transmisyon elektron mikroskopisinde, elektron demeti, ağır metallerle boyanmış bir örnek içerisinden geçer. Tarama elektron mikroskopisinde, üç boyutlu görüntü oluşturmak üzere, örnek yüzeyinden yansıyan elektronlar analiz edilir.

elektron taşıma zinciri Elektronların yüksek enerji düzeyinden, daha düşük enerji düzeyine içerisinden geçerek taşındığı bir dizi taşıyıcı.

elektron tomografi Elektron mikroskobu ile elde edilen çok sayıda iki boyutlu görüntünün bilgisayar analizi ile üç boyutlu görüntülerin oluşturulduğu yöntem.

elektroporasyon DNA'nın hücrelerin içine, kısa elektrik akımı uygulanarak sokulması.

Elk-1 ERK fosforilasyonu ile aktiflenen ve acil-erken genlerin ekspresyonunu uyaran bir transkripsiyon faktörü.

embriyonik kök (ES) hücre Erken embriyodan kültüre edilen kök hücreler.

endokrin sinyal iletimi Endokrin hücrelerden salgılanan hormonların, dolaşımla, uzaktaki hedef hücrelere taşındığı hücre-hücre etkileşim şekli.

endoplazmik retikulum (ER) Protein işlenmesi ve dağıtımı ile lipid sentezinde görevli, zarla çevrili tüp ve keselerden oluşan geniş bir ağ.

endorfin Doğal analjezik etkili bir nöropeptid.

endosimbiyoz Bir hücrenin daha büyük bir hücre içerisinde yerleştiği simbiyotik ilişki biçimi.

endositoz Hücre dışı materyalin, plazma zarından oluşmuş vezikül ile içeri alınması.

endozom Endositozla alınan materyalin ayrıştırılması ve lizozoma aktarılması ile görevli kese şeklindeki bölme.

enkefalin Doğal analjezik etkili bir nöropeptid.

enzim Biyolojik tepkimeleri katalizleyen proteinler ya da RNA'lar.

epidermal büyüme faktörü (EGF) Hücre çoğalmasını uyaran bir büyüme faktörü.

epigenetik kalıtım DNA dizisi içerisinde yer almayan bilginin ebeveynden yavrulara aktarılması.

epitel hücreler Vücudun yüzeyini kaplayan ve iç organları saran tabakaları (epitel doku) oluşturan hücreler.

Epstein-Barr virüsü B-hücre lenfomalarına neden olan bir insan herpesvirüsü.

ErbA Tiroid hormonu reseptörüne karşılık gelen bir proto-onkogen.

***erb*B-2** Meme ve over kanserlerinde, genellikle amplifiye olan ve bir reseptör protein kinaz kodlayan proto-onkogen.

ER-ilişkili yıkım (ERAD) ER'de yanlış katlanmış proteinlerin tanımlandığı ve übikütin-proteozom sistemleri tarafından yıkılmaları için sitozole gönderildikleri süreç.

eritrosit Kırmızı kan hücresi.

ERK Büyüme faktörüyle uyarılan, hücre çoğalmasında temel rol oynayan bir MAP kinaz ailesi üyesi.

Escherichia coli (E. coli) Moleküler biyoloji alanında yaygın bir şekilde model sistem olarak kullanılan bir bakteri türü.

etilen Meyve olgunlaşmasını sağlayan bir bitki hormonu.

etyoplast Klorofilin henüz sentezlenmemiş olduğu, kloroplast gelişiminin bir ara aşaması.

F

$FADH_2$ Bkz. Flavin adenin dinükleotid.

fagolizozom Bir fagozom ya da otofagozom ile birleşen lizozom.

fagositoz Bakteriler gibi büyük partiküllerin hücreler tarafından alınması.

fagozom Fagositozla alman partikülü içeren vakuol.

FAK (fokal adezyon kinaz) İntegrin sinyal iletiminde önemli rol oynayan bir non-reseptör protein-tirozin kinaz.

falloidin Aktin Elamanlarına bağlanarak dağılmalarını engelleyen bir ilaç.

faz-kontrast mikroskopisi Hücre bölümleri arasındaki yoğunluk ve kalınlık farklılıklarını, son görüntüye kontrast farklılığı olarak aktaran bir mikroskopi tipi.

fenotip Bir organizmanın fiziki görünümü.

Fertilizasyon (döllenme) Sperm ve yumurta hücresinin birleşmesi.

fırça kenar Mikrovili tabakasına sahip bir hücre yüzeyi (örn., barsak epitel hücresi).

fibroblast Bağ dokusunda bulunan bir hücre tipi.

fibronektin Hücre dışı matrksin başlıca adezyon proteini.

filamanı [F] aktin Filamanlar şeklinde polimerize olan aktin monomerleri.

filamin Aktin Elamanlarını ağ oluşturmak üzere çapraz bağlayan bir aktin-bağlayan protein.

filopodyum Plazma zarının aktin demetleri tarafından desteklenen ince uzantısı.

fimbrin Hücre yüzey uzantılarının oluşumunda rol alan bir aktin demetleme proteini.

flavin adenin dinükleotid (FADH2) Oksitlenme (yükseltgenme) ve redüklenme (indirgenme) reaksiyonlarında elektron taşıyıcı görevi üstlenen bir koenzim.

flipaz Endoplazmik retikulum membranı boyunca lipidlerin translokasyonunu katalizleyen protein.

floresan ile aktifleştirilen hücre ayırıcı Floresan yoğunluklarını bağlı olarak hücreleri tek tek ayıran cihaz.

floresan mikroskopi Moleküllerin, floresan ışık yayılımı yoluyla belirlenmesine olanak veren bir mikroskopi türü.

floresan rezonans enerji transferi (FRET) Canlı hücrelerde protein etkileşimlerini çalışmak için kullanılan bir yöntem.

fokal adezyon Hücrelerin, integrinlerin aktin filaman demetlerine bağlanması yoluyla hücre dışı matrikse tutundukları bölgeler.

formin Aktin filamanlarını başlatan ve polimerize eden aktin-bağlayan bir protein.

Fos Büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak aktifleşen bir proto-onkogen tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörü.

fosfatidi letanol amin Baş grubu etanolaminden oluşan bir gliserol fosfolipid.

fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfat (PIP_3) PIP_2'nin fosforillenmesiyle oluşan bir ikincil mesajcı.

fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfat (PIP_2) Plazma zarının iç tabakasının bir fosfolipid bileşeni. Hormonlar ve büyüme faktörleriyle uyarılan fosfolipaz C tarafından hidrolize edilir ve ikincil mesajcılar; diaçilgliserol ile inositol trifosfat oluşur. PI 3-kinaz tarafından fosforilasyonu ise ikinci mesajcı PIP3'ü oluşturur.

fosfatidilserin Baş grubu serinden oluşan bir gliserol fosfolipid.

fosfatidilinozitid 3-kinaz (PI3-kinaz) PIP_2'yi fosforilleyerek, ikincil mesajcı fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfatı (PIP_3) oluşturan bir enzim.

fosfatidillinozitol baş grubu inozitolden oluşan bir gliserol fosfolipid.

fosfodiester bağı Bir nükleotidin 5′-fosfatı ile diğerinin 3′-hidroksili arasındaki bağ.

fosfolipaz C Diaçilgliserol ve inositol trifosfat ikincil mesajcılarını oluşturmak üzere, PIP_2'yi hidrolize eden enzim.

fosfolipid çift tabaka Biyolojik zarların temel yapısıdır; fosfolipidler, hidrofobik kuyrukları zar içerisine gömülü, hidrofilik baş gruplan ise her iki yanda sulu ortama açık olarak yerleşmiştir.

fosfolipid Hücre zarlarının esas bileşenidir, fosfat içeren bir polar baş grubuna bağlı iki hidrokarbon zincirinden (genellikle yağ asiti) oluşur.

fosfolipid taşıyıcı protein Hücre zarları arasında fosfolipidleri taşıyan protein.

fosforillenme Bir moleküle fosfat grubu eklenmesi.

fosfotidilkolin Kolinden oluşmuş bir baş grubuna sahip gliserol fosfolipid.

Foto-ağartma sonrası floresan geri kazanım (FRAP) Canlı hücrelerde proteinlerin hareketini çalışmak için kullanılan bir yöntem.

fotoreaktivasyon Pirimidin dimerlerini ayırmak için güneş enerjisinin kullanıldığı DNA onarım mekanizması.

fotosentez Hücrelerde, güneş ışığı enerjisinden yararlanarak su ve CO_2'den glukoz sentezleyen işlem.

fotosistem I Tilakoid zarda bulunan ve güneş ışığından elde edilen enerjiyi NADPH sentezlemek için kullanan protein kompleks.

fotosistem II Tilakoid zarda bulunan ve güneş ışığından elde edilen enerjiyi ATP sentezlemek için kullanan protein kompleks.

fotosolunum Bir fotosentez yan ürününü metabolize eden bir işlem.

G

G proteini Guanin nükleotid bağlanmasıyla denetlenen bir hücre sinyal iletim proteinleri ailesi.

G proteinleri-eşlikli reseptörler Zarı yedi kez kat eden α heliks yapılarıyla tanınan bir reseptör. Ligand bağlanması, G proteinini aktifleştiren konformasyonel değişikliğe neden olur.

G_0 Hücrelerin metabolik aktivite gösterdikleri ancak çoğalmadıkları, devinimsiz dönem.

G_1 evresi Hücre döngüsünün, mitozun sonu ile DNA sentezi başlangıcı arasındaki evresi.

G_1 siklinler (Cln'ler) START'dan geçmeyi sağlayan maya siklinleri.

G_2 evresi Hücre döngüsünün, S evresinin sonu ile mitozun başlangıcı arasındaki evresi.

γ geçici ekspresyon Kültüre edilen hücrelere verilen entegre olmamış plasmid DNA'larının ekspresyonu.

geçiş durumu Bir enzimatik reaksiyon süresince substratların geçmek zorunda oldukları bir yüksek enerji durumu.

gen ailesi Ortak atasal genin duplikasyonu ile türemiş benzer genler grubu.

gen amplifikasyonu Bir DNA bölgesinin tekrarlayan replikasyonu sonucunda bir genin kopya sayısının artması.

gen Bir polipeptid zinciri ya da bir RNA molekülü kodlayan DNA bölgesine karşılık gelen, kalıtımın fonksiyonel bir birimi

gen transferi Bir hücreye yabancı DNA'nın aktarılması.

genel transkripsiyon faktörleri Genel transkripsiyon mekanizmasında yer alan transkripsiyon faktörleri.

genetik kod (şifre) Nükleotid üçlüleri ile proteindeki amino asitler arasındaki anlam uyumu.

genomik damgalanma Ekspresyonu anneden ya da babadan kalıtılmış olmasına bağlı olan genlerin, DNA metilasyonu ile regülasyonu.

genotip Bir canlının genetik bileşimi.

Gerçek-zamanlı (real-time) PCR Bir örnekte var olan hedef DNA ya da RNA miktarının kantitasyonunu için polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) kullanıldığı bir yöntem.

geribesleme (feedback) inhibisyonu Bir metabolik yolak ürününün, kendi sentezinde rol alan bir enzimin aktivitesini engellediği bir allosterik regülasyon tipi.

geribesleme döngüsü (feedback loop)Bir sinyal ileti yolağının alt basamağındaki bileşeninin, yolağın üst basamağındaki bir bileşenin aktivitesini kontrol ettiği düzenleyici mekanizma.

Gibbs serbest enerjisi (G) Kimyasal bir tepkimenin enerjetik olarak uygun yönünü belirlemek üzere entalpı ve entropi etkilerini birleştiren bir termodinami fonksiyonu.
giberellin Bir bitki hormonu.
glikojen Hayvanlarda başlıca karbohidrat depo şekli olan glukoz polimeri.
glikokaliks Hücre yüzeyini kaplayan karbohidrat kılıf.
glikolipid Karbohidrat içeren bir polar baş kısmına bağlı iki hidrokarbon zincirinden oluşan lipid.
glikoliz Glukozun anaerobik yıkımı.
glikoprotein Oligosakkaridlere bağlı protein.
glikozaminoglikan (GAG) Hücre dışı matrikste bulunan ve jel oluşturan bir polisakkarid.
glikozidik bağ Oligosakkarid ya da polisakkaridlerde şeker birimleri arasında oluşan bağ.
glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapası Proteinleri plazma zarının dış yüzeyine sabitleyen, fosfatidilinositol içerikli glikolipidler.
glikozillenme Proteinlere karbohidrat eklenmesi.
glioksalat döngüsü Bitkilerde yağ asitlerinin karbohid ratlara dönüşümü.
glioksizom İçerisinde glioksalat döngüsünün yer aldığı peroksizomlar.
gliserol fosfolipidler Gliserol molekülüne bağlı iki yağ asidinden oluşan fosfolipidler.
globuler (G) aktin Filaman yapısına katılmamış aktin monomerleri.
glukokortikoid Glukoz üretimini uyarmak için adrenal bez tarafından üretilen bir steroid.
glukoneogenez Glukozun sentezlenmesi.
Golgi aygıtı Protein ve lipidlerin işlenmesinde ve dağıtımında görevli bir sitoplazmik organel. Bitki hücrelerinde, aynı zamanda hücre duvarı polisakkaridlerinin sentezlendiği yer.
Golgi kompleksi bkz. Golgi cisimciği.
granülosit İnflamatuar reaksiyonlarında rol alan bir kan hücresi türü.
GTPaz-aktifleyici proteinler Küçük GTP-bağlayan proteinler tarafından GTP'nin hidrolizini uyaran proteinler.
guanilil siklaz GTP'den siklik GMP oluşumunu katalizleyen enzim.
guanin nükleotid değişim faktörü (GEF) Bağlı GDP'nin GTP ile değişimini uyarmak için küçük GTP-bağlayıcı proteinler üzerinde etki eden bir protein.
guanin Sitozin ile eşleşen pürin.
Güçlendirici (enhancer) Promotordan uzak bir bölgede yer alabilen transkripsiyon düzenleyici bir dizi.

H

haploid Her kromozomun tek kopyasına sahip hücre veya canlı.
hata-düzeltme Yanlış eşleşmiş bazların DNA polimerazlar tarafından seçici olarak uzaklaştırılması.
hatalı eşleşme tamiri Yeni sentezlenen DNA zincirlerinde hatalı eşleşen bazları uzaklaştıran tamir mekanizması.
Hedgehog Embriyonik gelişim süresinde hücre kaderini düzenleyen bir yolağı uyaran, salgılanan sinyal ileti molekülü.
helikaz DNA sarmalının açılmasını katalizleyen enzim.
hematopoetik kök hücre transplantasyonu Hematopoetik sistem kanser ve hastalıklarının tedavisinde hematopoetik kök hücre naklinin kullanıldığı bir klinik uygulama.
hemidesmozom Hücrelerle hücre dışı matriks arasında, keratin ipliklerinin integrinlere tutunduğu temas noktası.
hemisellüloz Bitki hücre duvarında selüloz mikrofibrillerini birbirine bağlayan bir polisakkarid.
hepatit B virüsleri Karaciğer hücrelerini enfekte eden ve karaciğer kanseri gelişmesine neden olabilen bir DNA virüs ailesi.
hepatit C virüsleri Karaciğer hücrelerini enfekte eden ve karaciğer kanseri gelişmesine neden olabilen bir RNA virüs ailesi.
herpesvirüs Bazı üyeleri kanseri indükleyen bir DNA virüs ailesi.
heterofilik etkileşim İki farklı tipteki hücre adhezyon molekülü arasındaki bir bağlantı.
heterokromatin Yoğunlaşmış, transkripsiyonel olarak inaktif kromatin.
heterotrimerik G proteini Üç alt birimden oluşmuş, guanin nükleotidi bağlayan bir protein.
hız santrifügasyonu (*velocity centrifugation*) Partiküllerin sedimentasyon oranlarına göre ayrılması.
hidrofilik Suda çözünür.
hidrofobik Suda çözünmez.
histon asetillenmesi Histonların sipesifik lizin birimlerine asetil grupları eklenerek modifiye edilmesi.
histon Ökaryot kromozomlarında DNA'yı paketleyen protein ailesinin bir üyesi.
homeodomein Embriyonik gelişim sürecinde, gen ekspresyonlarını düzenleyen transkripsiyon faktörlerinde bulunan bir tip DNA bağlanma bölgesi.
homofilik etkileşim Aynı tip adezyon molekülleri arasındaki etkileşim.
homolog rekombinasyon homolog nükleotid dizilerine sahip DNA bölgeleri arasındaki rekombinasyon.
hormon Endokrin bezlerinden üretilen ve vücudun uzak bölgelerindeki hücreleri etkileyen sinyal molekülleri.
hücre adhezyon molekülleri Hücre-hücre etkileşimlerini sağlayan bir transmembran protein.
hücre dışı matris Hücreler arası alanları dolduran ve hücreleri ve dokuları birbirine bağlayan, salgılanmış protein ve polisakkaridler.

hücre döngüsü kontrol noktası Hücre döngüsünde bir evredeki olaylar tamamlanmadan bir sonraki evreye geçişi önleyen denetim noktası.
hücre duvarı Bakteri, mantar ve bitki hücreleri dışında bir tabaka oluşturarak yapısal destek sağlayan, sert ve gözenekli yapı.
hücre hatları Kültürde sonsuz çoğalabilen hücreler.
hücre içi sinyal iletimi Kimyasal sinyalleri hücre yüzeyinden hücre içi hedeflere ileten reaksiyonlar zinciri.
hücre iskeleti Ökaryot hücrelerde sitoplazmanın her yanına uzanan protein filamanları ağı. Hücrenin çatısını oluşturur ve hücre hareketinden sorumludur.
hücre korteksi Plazma zarının altını kaplayan aktin ağı.
hücre transformasyonu Kültürdeki normal hücrelerin kanser hücresine dönüşmesi.

I

IAP *Apoptoz* inhibitörü. Kaspazlar ile etkileşerek apoptozu inhibe eden bir protein ailesinin bir üyesi.
ışık reaksiyonları Güneş enerjisinin ATP ve NADPH üretimini yönettiği fotosentez reaksiyonları.
IκB NF-IκB transkripsiyon faktörlerinin bir inhibitör alt ünitesi.

İ

iç-içe (nested) gen Daha büyük bir genin intronu içinde bulunan gen.
iğ yapılanması denetim noktası Kromozomların metafazdaki iğ iplikleri ile eşleşmesini denetleyen hücre döngüsü kontrol noktası.
iki boyutlu jel elektroforezi Hücre proteinlerini yüklerine ve boyutlarına göre ayıran bir metod.
ikinci mesajcı Ligand-reseptör bağlantısının sonucunda metabolizması değişen, diğer hücre içi süreçleri düzenleyerek bir sinyal iletici görevi yapan bir bileşik.
ikincil hücre duvarı Bölünmesi duran bitki hücrelerinde plazma zarı ile primer hücre duvarı arasına yerleşen, kalın hücre duvarı.
ikincil yanıt geni Bir hücrede protein sentezi gerektiğinde, büyüme faktörü uyarısını takiben tetiklenen gen.
ikincil yapı Amino asitlerin, belirli polipeptid bölgelerindeki düzenli yapılanması. Bkz. α-sarmal ve β-tabakası.
ileri besleme düzenleyicileri (feedforward relays) Bir sinyal ileti yolağı bileşeninin, yolağın alt basamağındaki bir bileşeni uyardığı düzenleyici mekanizma.
immün çöktürme Antikorları kullanılarak proteinlerin izolasyonu.
immünblot SDS- poliakrilamid jel ile ayrılan proteinleri saptamak için antikor kullanılan bir yöntem. Southern blot'ın bir varyasyonu olup Western blot olarak da adlandırılır.
immünglobulin (Ig) süper ailesi İmmünglobulinlere benzer yapısal bölgeler içeren bir hücre adezyon molekül ailesi.
immünglobulin Bkz. antikor.
importin Nükleer yerleşim sinyallerini tanıyarak çekirdek içerisine geçişi yöneten bir karyoferin.
***in situ* hibridizasyon** Yapısı bozolmamış bütün bir hücrede ya da kromozomlarda RNA veya DNA dizilerini belirlemek amacıyla radyoaktif veya floresan işaretli probların kullanılması.
***in vitro* mutagenez** Klonlanmış DNA'da *in vitro* koşulda mutasyon oluşturulması.
***in vitro* translasyon** Hücre-içermeyen özütle protein sentezi.
indüklenmiş pluripotent kök hücre Bir embriyonik kök hücreye benzemesi için kültür ortamında yeniden proglamlanan yetişkin vücut hücresi.
indüklenmiş uyum Sübstrat bağlanınca, hem enzimin hem de sübstratın konfigürasyon değiştirdiği enzim etki modeli.
inositol 1, 4, 5-trifosfat (IP_3) PIP_2 hidroliziyle oluşan ve kalsiyum iyonlarının endoplazmik retikulumdan salınmasını uyaran bir ikincil mesajcı.
integral zar proteini Hücre zarlarının lipid çift tabakası içerisine gömülü bir protein.
integrin Hücrelerin hücre dışı matrikse yapışmasını sağlayan transmembran bir protein.
interfaz Hücre döngüsünde; G_1, S ve G_2 evrelerini kapsayan, iki mitoz arası dönem.
interpolar mikrotübül Hücrenin ortasında üst üste çakışan ve iğ ipliklerini ayrı kutuplara iten mitotik iğ ipliklerinden bir mikrotübül sınıfı.
intron Gen içinde eksonlan birbirinden ayıran, kodlamayan dizi.
işlenmiş psödogen Mesajcı RNA'nın ters transkripsiyonu ile oluşan bir psödogen.
iyon kanalı Fosfolipid çift tabakada açık geçitler oluşturarak, iyonların zardan kolayca geçmesini sağlayan bir protein.
iyon pompası ATP hidroliziyle iyonların zardan geçişini düzenleyen bir protein.

J

janus kinaz (JAK) Sitokin reseptörleriyle birlikte çalışan, reseptör olmayan bir protein-tirozin kinaz ailesi.
jel elektroforezi Moleküllerin, bir elektrik alanındaki hareket özelliklerine göre ayrılmalarını sağlayan yöntem.
jun Bir proto-onkogenden kodlanan ve büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak aktifleşen bir transkripsiyon faktörü.

K

kaba endoplazmik retikulum (ER) Ribozomlarla kaplı olan ve protein metabolizmasıyla yükümlü olan endoplazmik retikulum bölgesi.

kaderinler Aterens bağlantılarda ve desmozomlarda, sağlam hücre-hücre bağlantıları oluşturan, bir hücre adezyon molekül grubu.

kallus Kültürdeki, farklılaşmamış bitki hücre kümesi.

kalmodulin Kalsiyum bağlayan bir protein.

kalneksin ER lümeninden glikoprotein katlanmasına katılan bir şaperon.

kalretikülin ER lümeninin zarında, glikoprotein katlanmasına katılan bir şaperon.

kamçı Hücre hareketinden sorumlu mikrotübül-bazlı plazma membranı uzantısı

kanal proteinleri Bir zarın içerisinde geçit oluşturan proteinler.

kanser Malin tümör.

Kaposi sarkomu ile ilişkili herpesvirus Kaposi sarkomuna neden olan bir insan herpesvirusu.

karanlık reaksiyonlar Fotosentez sırasında, karbondioksit ve suyu karbohidratlara dönüştüren bir dizi reaksiyon, Bkz. Calvin döngüsü.

kararlılık geni Genom bütünlüğünün korunmasında rol alan ve kaybı ile kanser oluşabilen bir gen.

karbohidrat $(CH_2O)_n$ formülüne sahip molekül. Karbohidratlar, basit şekerleri ve polisakkaridleri kapsar.

kardiyolipin Dört hidrokarbon zincirli bir fosfolipid.

karsinojen Kansere neden olan etmen.

karsinom Epitel hücrelerinin kanseri.

karyoferin Bir nükleer taşıma reseptörü.

kas lifi Gelişim sırasında, birbirinden ayrı pek çok hücrenin füzyonu ile oluşan geniş bir iskelet kas hücresi.

kasılan demet Miyozin II ile etkileşen ve kasılma yetisi bulunan bir aktin filaman demeti.

kasılan halka Mitoz sırasında plazma zarının altında oluşan ve sitokinezi sağlayan, aktin ve miyozin II içeren yapı.

kaspazlar Programlanmış hücre ölümüne yol açan bir proteaz ailesi.

katalaz Hidrojen peroksidi ayrıştıran enzim.

katenin Adheren kavşaklarda aktin flamanlarını kaderinlere bağlayan bir grup sitoplazmik protein (α-katenin ve β-katenini içeren).

Katlanmamış protein yanıtı (*unfolded protein response* UPR) Endoplazmik retikulumda katlanmamış protein artış, protein sentezinin genel inhibisyonuna, artmış şaperon ekspresyonuna ve artmış proteozom aktivasyonuna yol açtığı bir hücresel stres yanıtı.

kaveola Endositozla ilişkili olabileceği düşünülen, küçük plazma zarı girintileri.

kayan filaman modeli Aktin ve miyozin filamanlarının birbiri üzerinde kayması sonucu kasılma şeklinde görülen kas kasılma modeli.

kemik iliği transplantasyonu Hematopoetik sistem kanser ve hastalıklarının tedavisinde, kemik iliği kök hücresi naklinin kullanıldığı bir klinik uygulama.

kemiozmotik eşlenme Zarın iki yanındaki proton gradientinde tutulan enerjiyle ATP oluşturulması.

kendi-kesip ekleyen (self-splicing) Bazı RNA'ların kendi intronlarının uzaklaştırılmasını katalizleme yetisi.

keratin Epitel hücrelerinde bulunan bir ara filaman çeşidi.

kesikli iplik Replikasyon çatalı hareketinin tersi yönünde, Okazaki fragmanlarının ligasyonu ile sentezlenen DNA ipliği.

kısa interfere-edici RNA (siRNA) RNA interferens yolağında rol alan kısa, kodlamayan çift zincirli bir RNA.

kilobaz (kb) Bin nükleotid veya nükleotid baz çifti.

kinetokor mikrotübülleri Yoğunlaşmış kromozomlara sentromerlerinden bağlanan bir mitotik iğ mikrotübülleri.

kinetokor Sentromere bağlanan proteinlerden oluşan ve kromozomların mitoz iğine bağlanmasını ve hareketlerini sağlayan özelleşmiş bir yapı.

kinezin Mikrotübüller üzerinde genellikle artı uca doğru hareket eden bir motor proteini.

kirpik Hücreyi sıvı içerisinde ya da sıvıyı hücre üzerinde hareket ettiren, mikrotübül-tabanlı plazma zarı çıkıntısı.

kitin Mantar hücre duvarının ana bileşeni olan bir N-asetilglukozamin polimeri.

kiyazma Mayoz sırasında homolog kromozomları birbirine bağlayan rekombinasyon bölgeleri.

klatrin bağımsız endositoz Çok sayıda endositoz yolağından biri, özel plazma zarı reseptörleri veya kaplı-vezikül oluşumu ile düzenlemez.

klatrin Hücre zarının sitoplazmik yüzeyini kaplayan ve vezikül tomurcuklanmasını başlatmak üzere, sepete benzer kafesler şeklinde birleşen bir protein.

Klatrin--aracılı endositoz Klatrin kaplı çukurlarda yoğunlaşan reseptörler ile spesifik makromoleküllerin seçici alımı.

klatrin-kaplı çukurcuk Endositozla içeri alınacak makro moleküllerin reseptörlerini içeren, plazma zarının özel bir bölümü.

klatrin-kaplı vezikül Klatrinle kaplı bir taşıma keseciği.

klonal seçilim Tümör hücrelerinin yeni klonlanlarının artmış büyüme hızı veya diğer özelliklere (örneğin sağ kalım, invazyon ya da metaztaz) göre kendilerine seçici avantaj sağlayan evrimleşeme süreci.

klorofil Bitki hücrelerinin temel fotosentez pigmenti.

kloroplast Bitki hücrelerinde ve yeşil alglerde fotosentezden sorumlu organel.

Knockout Klonlanmış mutant bir allel ile kromozomal bir genin homolog rekombinasyon ile inaktivasyonu.
koaktivatör Transkripsiyonu uyarmak için transkripsiyon faktörleri ile etkileşen bir protein.
3' kodlamayan bölge (UTR) mRNA'nın 3' ucunda yer alan kodlamayan bir bölge.
5' kodlamayan bölge (UTR) mRNA'nın 5' ucunda yer alan kodlamayan bir bölge.
kodon Genetik şifrenin temel birimi; bir amino asit kodlayan veya durma dizini şeklindeki 64 nükleotid üçlüsünden her biri.
koenzim A (CoA-SH) Metabolik tepkimelerde asetil grubu taşıyıcısı olarak görev yapan bir koenzim.
koenzim Biyolojik reaksiyonları katalizlemek için enzimler ile birlikte çalışan düşük molekül ağırlıklı organik moleküller.
koenzim Q Mitokondri elektron taşıma sisteminde, protein kompleksler arasında elektron taşıyan, küçük, yağda çözünen bir molekül.
kofilin Aktin filamları ayrıştıran aktin bağlayıcı bir protein.
kohesin Kardeş kromatidler arasındaki bağlantının sürekliliğini sağlayan bir protein kompleksi.
kolaylaştırılmış difüzyon Moleküllerin taşıyıcı ya da kanallar vasıtasıyla zardan geçmesi.
kolesterol Dört hidrokarbon halkasından oluşan bir lipid. Kolesterol, hayvan hücresi plazma zarlarının majör bir bileşeni ve steroid hormonların öncülüdür.
kollajen Hücre dışı matriksin başlıca yapısal proteini.
Kollajen lif Kollajen moleküllerinin düzenli olarak bir araya gelmesiyle oluşan lif.
kolsemid Mikrotübül polimerleşmesini durduran bir ilaç.
kolsişin Mikrotübül polimerleşmesini durduran bir ilaç.
kondensin Metafaz kromozomunu yoğunlaşmaya yönlendiren bir protein kompleksi.
konfokal mikroskopi Yüksek kontrast ve detaylı görüntüler elde etmek için, floresan mikroskobu ile bir elektronik görüntü analizleyicinin birleştirildiği bir mikroskopi şekli.
konneksin Aralık bağlantıları oluşturan transmembran proteinler ailesinin bir üyesi.
konnekson Plazma membranında altı konneksinin oluşturduğu bir silindirik bir yapı.
kontakt inhibisyon Hücre-hücre teması sonucunda, normal hücrelerin çoğalmasının veya hareketlerinin engellenmesi.
Konvansiyonel olmayan miyozin Kas hücrelerinde bulunandan (miyozin II) farklı bir miyozin tipi.
koreseptör (eşbaskılayıcı) Baskılayıcılarla birlikte, genellikle kromatin yapısını değiştirerek, gen ifadesini engelleyen protein.
kortikosteroid Adrenal bezinin ürettiği steroid hormon.
kozmid Bakteriyofaj λ dizileri, antibiyotik direnç dizileri ve bir replikasyon orijinine sahip vektör. 45 kb'ye kadar büyük DNA eklentilerini barındırabilir.
kök hücre Bölündüğünde, farklılaşabilen ya da kök hücre olarak kalabilen yavru hücreler oluşturan bir hücre.
Krebs döngüsü Bkz. sitrik asit döngüsü.
krista İç mitokondri zarının, matriks içine doğru uzayan kıvrımı.
kromatin immün çöktürme Hücre içinde, DNA'nın transkripsiyon faktörlerine bağlanma bölgelerini belirlemek için bir metod.
kromatin Ökaryot DNA ve histonlardan oluşan ipliksi kompleks.
kromatin yeniden modelleme faktörü DNA ile histonlar arasındaki bağlantıları değiştirerek kromatin yapısını bozan bir protein.
kromatozom Bir histon koru çevresine dolanmış 166 baz çifti uzunlukta DNA ve bunları tutan bir bağlayıcı histondan oluşan kromatin alt birimi.
kromoplast Karotenoidler içeren plastid.
kromozom Uzun DNA molekülleri ve ilişkili proteinleri içeren, bir gen taşıyıcı.
kromozomal mikrotübül Yoğunlaşmış kromozomların uçlarına bağlananan mitotik iğ mikrotübülü.
kuarterner yapı Birden fazla polipeptid içeren proteinlerdeki polipeptid zincirlerinin arasındaki etkileşim.
küçük nükleer ribonükleoprotein partikülleri (snRNP) snRNA'ların proteinlerle oluşturdukları kompleks.
küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar) Büyüklükleri 50 ile 200 baz arasında değişen nükleer RNA'lar.
küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA) Nükleolus bölgesinde bulunan ve pre-rRNA işlenmesinde rol oynayan küçük RNA'lar.
kütle spektrometresi Bileşiklerin tanımlanması için kütlelerinin doğru belirlenmesi üzerine kurulu bir yöntem. Kütle spektrometresi proteinlerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılır.

L

lamellipod Fibroblast hareketinde rol oymayan, plazma zarının dışa doğru yaptığı aktin-içerikli geniş uzantı.
lamin Nükleer laminayı oluşturan bir ara filaman proteini.
Lamina-ilişkili domain (LAD) Nükleer lamina ile ilişkili bir heterokromatin bölge.
laminin Bazal laminanın başlıca adezyon proteini.
lenfoma Lenfoid hücrelerin bir kanseri.
lenfosit Bağışıklık yanıtında görevli bir kan hücresi. B lenfositler antikorları üretir ve T lenfositler hücresel bağışıklık yanıtından sorumludur.
Leptoten Homolog kromozom çiftlerinin yoğunlaşması öncesinde, mayoz I'in, uzamış profaz evresinin başlangıç safhası.

LINE (uzun, serpiştirilmiş elemanlar) Memeli genomlarında yüksek düzeyde tekrarlayan bir retrotranspozon ailesi.
ligand-kapılı kanallar Sinyal moleküllerinin bağlanmasına yanıt olarak açılan iyon kanalları.
lignin İkincil hücre duvarlarını güçlendiren, fenol birimlerinden oluşan polimer.
lipid Enerji depo molekülleri, sinyal molekülleri ve plazma zarlarının ana bileşeni olarak görev üstlenen hidrofobik bir molekül grubunun üyesi.
lipid salı Plazma membranının kolesterol ve sifingolipid kümelerinden oluşan özelleşmiş bir bölgesi
lipozom DNA'yı memeli hücrelerinin içine sokmak amacıyla kullanılan bir lipid vezikülü.
lizozom Biyolojik polimerleri yıkan enzimler içeren bir sitoplazmik organel.
lizozomal depo hastalıkları Etkilenen bireylerin, lizozomlarmda yıkılmamış madde birikimi ile karakterize bir hastalık grubu.
lökoplast Fotosentez yapmayan bitki dokularında enerji kaynaklarını depolayan bir plastid.
lökotrien Araşidonik asitten sentezlenen bir eikozanoid.
lösemi Dolaşımdaki kan hücrelerinin öncülerinden köken alan kanser.
lösin fermuarı Birçok transkripsiyon faktöründe görülen, tekrarlayan lösin birimlerine sahip protein dimerleşme bölgesi.

M

M evresi Hücre döngüsünün mitoz evresi.
makrofaj Fagositoz için özelleşmiş bir beyaz kan hücresi.
makropinositoz Sıvıların büyük veziküller (kesecikler) içerisinde alınması.
malin tümör Normal dokuyu istila eden ve tüm vücuda yayılan tümör.
mannoz-6-fosfat Proteinleri lizozomlara yönlendiren modifiye edilmiş mannoz kalıntısı.
MAP kinaz Hücre çoğalması ve farklılaşmasında yaygın regülatör etkiye sahip, bir mitojen tarafından aktive edilen protein-serin/treonin kinaz ailesi.
matriks işlemci peptidazı (MPP) Mitokondri matriksine alınan proteinlerin öncül dizilerini kesen proteaz.
matriks Mitokondri iç alanı.
maya En basit tek hücreli ökaryot. Mayalar, ökaryot hücrelerin araştırılması için önemli örneklerdir.
maya ikili hybrid sistemi Birbirleri ile etkileşime giren proteinleri tanımlamak için maya genetiğinin kullanıldığı bir yöntem.
maya yapay kromozomu (YAC) Maya hücrelerinde bir kromozom olarak replike olabilen ve oldukça büyük DNA eklentilerini (yüzlerce kb) barındırabilen bir vektör.
mayoz Diploid hücrelerin, ardışık iki nükleer ve hücresel bölünmeyi kapsayan süreçle haploid yavru hücrelere bölünmesi.
Mediyatör Ökaryotik protein kodlayan genlerin transkripsiyonunu uyaran ve gen-spesifik düzenleyici faktörlere yanıt vermelerine imkan veren bir proteinler kompleksi.
MEK (MAP kinaz/ERK kinaz) MAP kinazların ERK ailesi üyelerini fosforilleyen ve aktive eden, iki yönlü-özgüllüğe sahip, bir protein kinaz.
Merkel hücre polyoma virüsü İnsanlarda ender görülen bir deri kanserine (Merkel hücreli karsinom) neden olan papilloma virüsü.
Mesajcı RNA (mRNA) Bkz. mRNA
Mesajcı RNP Bkz. mRNP
metafaz Kromozomların, hücrenin merkezindeki bir metafaz plağına dizildikleri mitoz evresi.
metal gölgeleme Bir örneğin yüzeyinin buharlaştırılmış bir ince metal ile kaplanmasına dayalı bir elektron mikroskopi yöntemi.
metastaz Kanser hücrelerinin, kan veya lenfatik sistem yoluyla diğer organlara yayılması.
7-metilguanin kep Ökaryotik mRNA'ların 5' ucuna ilave edilen, GTP ve metillenmiş şekerler içeren bir yapı.
mikrofilaman Aktinden oluşan bir hücre iskelet filamanı.
mikroRNA (miRNA) Doğal olarak oluşan ve gen ekspresyonunu düzenlemesinde görev alan kısa, kodlamayan RNA.
mikrotübül Tübülinlerin polimerleşmesiyle oluşan, sert, yaklaşık 25 nm çapında, ortası oyuk çubuk şeklindeki hücre iskelet bileşeni.
mikrotübül-düzenleme merkezi Hücrenin merkezine yakın noktada bulunan, mikrotübüllerin dışarı doğru uzandıkları bir tutunma noktası.
mikrotübülle-ilişkili protein (MAP) Mikrotübüllere bağlanarak kararlılıklarını değiştiren bir protein.
mikrovilus Özellikle absorbsiyon yapan hücrelerin yüzeyinde çok miktarda bulunan, aktin-tabanlı plazma zar uzantıları.
mikrozom Hücreler parçalandığında ortaya çıkan, endoplazmik retikulumdan türemiş küçük bir vezikül.
mineralokortikoidler Adrenal bezi tarafından üretilen ve böbreği etkileyerek tuz-su dengesini düzenleyen bir steroid hormon.
mitokondriler Ökaryot hücrelerde, oksidatif fosforilasyonla ATP'lerin büyük kısmının sentezinden sorumlu sitoplazmik organeller.
mitotik denetim noktası kompleksi (mitotic checkpoint complex: MCC) Bağlı olmayan kinetekorlarda oluşan ve bütün kromozomlar metafaz iğ iplikleri üzerinde dizilene kadar anafaza geçişi inhibe eden proteinler kompleksi.

mitotik iğ Mitoz sırasında yavru kromozomların birbirinden ayrılmasını sağlayan, iğ kutuplarından çıkan bir mikrotübül dizisi. Ayrıca; kinetokor mikrotübülleri, kutup mikrotübülleri ve yıldızsı mikrotübüllere de bakınız.

mitoz Nükleer bölünme. Kardeş kromozomların ayrılmasının gerçekleştiği ve genellikle hücre bölünmesi (sitokinez) ile sona eren, hücre döngüsünün en çarpıcı evresidir.

miyofibril Kas hücrelerindeki aktin ve miyozin filaman demetleri.

miyozin Bir moleküler motor olarak aktin ile etkileşen protein.

miyozin hafif-zincir kinaz Regülatör hafif zincirini fosfatlayarak miyozin II'yi aktive eden protein kinaz.

miyozin I Aktin filamanlar üzerinde kargo taşıyan bir tip miyozin.

miyozin II Aktin filamanlarını kaydırarak kasılma gerçekleştiren miyozin tipi.

moleküler klon Bkz. rekombinant molekül.

moleküler klonlama İlgilenilen bir DNA fragmanının, konakçı hücrede bağımsız replike olabilen bir DNA molekülüne (vektör) eklenmesi.

moleküler motor Kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye dönüştürerek güç ve hareket üreten protein.

monoklonal antikor B lenfositlerin bir klonal hattı tarafından üretilen antikor.

monosakkaridler $(CH_2O)_n$ temel formülüne sahip basit bir şeker.

monosistronik Tek bir polipeptid zincirini kodlayan mesajcı RNA.

monosit Yangısal reaksiyonlarda görevli bir kan hücresi tipi.

Mos Mayoz I'den mayoz II'ye geçiş için ve omurgalı oositlerinin metafaz II'de tutulması için gerekli olan bir protein kinaz.

mRNA Protein sentezi için kalıp görevi gören bir RNA molekülü.

mRNP Proteinler ile ilişkili mRNA içeren mesajcı ribonükleoprotein partikülleri.

mTOR Büyüme faktörleri, besinler ve enerjinin varlığına cevap olarak, protein sentezini ve otofajiyi düzenlemede rol alan bir protein kinaz.

multi-foton eksitasyon mikroskopisi Örneğin, floresan boyanın uyarılması için iki ya da daha fazla fotonun absorplanmasını gerektirecek şekilde bir dalga boyunda ışıkla ışınlandığı bir floresan mikroskopi tarzı.

mutasyon Genetik değişiklik.

N

Na^+-K^+ ATPaz Bkz. Na^+-K^+ pompası.

Na^+-K^+ pompası Na^+'u hücre dışına ve K^+'u hücre içine taşıyan bir iyon pompası.

NAD^+ Bkz. nikotinamid adenine dinükleotid.

$NADP^+$ redüktaz Elektronları ferrodoksinden $NADP^+$'ye aktararak NADPH üreten enzim.

nekroptosis Enfeksiyon ya da DNA hasarı gibi uyaranlara karşı programlanmış bir cevap olarak tetiklenen bir tür nekrotik hücre ölümü.

nekroz Akut bir hasar sonucu hücrelerin rastgele ölümü.

neksin Aksonemde mikrotübül çiftlerini birbirine bağlayan bir protein.

nektin Adheren bağlantıların oluşumuna dahil olan bir hücre adhezyon molekülü.

Nernst eşitliği İyon konsantrasyonu ile zar potansiyeli arasındaki ilişki.

NF-κB Çeşitli uyaranlara yanıt olarak aktive olan bir transkripsiyon faktörleri ailesi.

nidojen Bazal laminadaki lamininler ve tip IV kolajen ile etkileşen bir ekstraselüler matriks protein.

nikotinamid-adenin dinükleotid (NAD^+) Yükseltgenme/indirgenme reaksiyonlarında elektron taşıyıcı olarak görev yapan bir koenzim.

niş Dokulardaki kök hücrelerin devamlılığını sağlayan mikroçevre.

nişasta Bitkilerde karbohidratların temel depo formu olan glukoz kalıntılarının bir polimeri.

N-miristoillenme Bir polipeptid zincirinde N-ucu glisin birimine miristik asit (14 karbonlu bir yağ asiti) eklenmesi.

Northern blot Mesajcı RNA'ların jel elektroforezi ile ayrılmasını takiben, özgül problarla hibridize edilerek tanımlandığı yöntem.

Notch Gelişim sırasında hücre-hücre etkileşimlerinin bir sonucu olarak, hücrenin kaderini düzenleyen bir sinyal yolağında rol alan bir transmembran reseptör.

nörofilaman (NF) protein Birçok olgun sinir hücresinde bulunan, ara filaman proteinleri ailesinin bir üyesi.

nörohormon Nöronlardan salgılanan ve uzak hücreleri etkileyen peptidler.

nöron Tüm vücuttan uyarıları almak ve iletmek üzere özelleşmiş bir sinir hücresi.

nöropeptid Nöronlardan salgılanan sinyal peptid molekülü.

nörotransmiter Bir sinapsta, sinyalleri uyarılmış nörondan bir hedef hücreye taşıyan, küçük, hidrofilik molekül.

nörotrofin Nöron gelişimini ve yaşamını düzenleyen polipeptid ailesinin bir üyesi.

nükleer cisim Nükleus içerisinde farklı bir organel.

nükleer çıkış sinyali Proteinleri nükleustan sitozole taşınmak üzere hedefleyen bir amino asit dizisi.

nükleer lamina Çekirdeğe yapısal destek sağlayan, lamin elemanlarından oluşmuş bir ağ örgüsü.

nükleer membran Nükleer zarfı oluşturan membran; dış nükleer membran endoplazmik retikulum ile devam eder ve iç nükleer membran nükleer laminaya bitişiktir.

nükleer por kompleksi Çekirdek zarfı içerisinde bir taşıma kanalı oluşturan büyük bir yapı.
nükleer reseptör süper ailesi Steroid hormon, tiroid hormonu, retinoik asit ve vitamin D3 reseptörlerini içeren bir transkripsiyon faktörleri ailesi.
nükleer transport reseptörü Nükleer lokalizasyon sinyallerini tanıyan ve nükleer zarf boyunca transporta aracılık eden bir protein.
nükleer yerleşim sinyali Proteinleri sitoplazmadan çekirdeğe taşınmak üzere hedefleyen amino asit dizisi.
nükleer zarf Bir iç ve dış membran, bir nükleer lamina ve nükleer por komplekslerinden oluşan, nükleusu sitoplazmadan ayıran bir bariyer.
nükleik asit hibridizasyonu Komplementer baz eşleşmesi ile, çift sarmal DNA ve/veya RNA moleküllerinin oluşması.
nükleolar oluşum bölgesi Ribozomal RNA'lar kodlayan genleri içeren kromozomal bir bölge.
nükleolus (çekirdekçik) Nükleusta rRNA sentezi, işlenmesi ve ribozomların yapılandırıldığı bölge.
nükleolus-ilişkili bölge (NAD) Nükleolus ile ilişkili heterokromatin bir bölge.
nükleotid Fosforillenmiş bir nükleozid.
nükleotid-çıkarma onarımı Hasarlı bazı içeren oligonükleotidlerin DNA yapısından çıkartıldığı DNA onarım mekanizması.
nükleozid Bir şekere (riboz veya deoksiriboz) bağlı pürin ya da pirimidin bazı.
nükleozom Bir histon çekirdeği ve etrafına sarılmış DNA'dan oluşan kromatinin temel yapısal birimi.
nükleozom çekirdek partikülleri H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının her birinden ikişer tane içeren bir histon oktameri ve çevresine dolanmış 146 baz çiftlik DNA'dan oluşan partikül.
nükleus (çekirdek) Ökaryot hücrelerde, genetik materyali içeren en önemli organel.

O

Okazaki fragmanı DNA'nın kesikli ipliğini oluşturmak üzere birbirine bağlanan, kısa DNA parçası.
oksidatif fosforilasyon Elektronların, elektron taşıma sisteminde son alıcı olarak moleküler oksijene, enerjetik yönden elverişli aktarımıyla eşlenen ADP'den ATP'nin sentezlenmesi.
oksidatif metabolizma Organik moleküllerin yıkımında moleküler oksijenin elektron alıcı olarak kullanılması.
oksin Bitki gelişiminin birçok yönünü denetleyen bir bitki hormonu.
olgunlaşmayı sağlayan faktör (MPF) Mitoz veya mayozun M evresine geçişi teşvik eden Cdk1 ve siklin B kompleksi.
oligonükleotid Birkaç nükleotidden ibaret, kısa polimer.
oligosakkarid Birkaç şekerden ibaret, kısa polimer.
onkogen bağımlılığı Kanser hücrelerinin, onkogenlerin devam eden aktivasyonuna bağımlılıkları.
onkogen Kanser hücresinin bir veya daha fazla karakteristik özelliğinin ortaya çıkmasını sağlayabilen bir gen.
operatör Bir operonun transkripsiyonunu denetleyen düzenleyici DNA dizisi.
operon Tek bir mRNA olarak transkripsiyonu yapılan bir grup komşu gen.
orijin tanıma kompleksi (ORC) Ökaryot replikasyon orijinlerinde DNA replikasyonunu başlatan bir protein kompleksi.
orta lamel Bitki hücresi duvarında komşu hücreleri bir arada tutan yapışkan görevi gören bir bölge.
otofagozom sitoplazmik zar parçalarıyla kuşatılmış, içsel organelleri içeren ve lizozomlarla birleşen bir vezikül.
otofaji Sitoplazmik proteinlerin ve organellerin, endoplazmik retikulumdan türeyen ve lizozomlarla birleşen veziküllere alınarak parçalanması.
otofosforillenme Bir protein kinazın kendi fosforillenmesini katalizlediği bir reaksiyon.
otokrin çoğalma uyarımı Hücre çoğalmasının, yanıt veren hücre tarafından üretilen büyüme faktörü ile uyarılması.
otokrin sinyal iletimi Hücrenin, kendi ürettiği büyüme faktörüne yanıt verdiği, bir hücre sinyal iletim türü.
otonom replike olan dizi (ARS) Mayada bulunan bir replikasyon orijini.

Ö

ökaryot hücre Nükleer zarfı, sitoplazmik organelleri ve hücre iskeleti bulunan bir hücre.
ökromatin Yoğun olmayan, transkripsiyonel olarak aktif interfaz kromatini.
öncü iplik Replikasyon çatalının hareketi yönünde, DNA'nın devamlı bir şekilde sentezlendiği iplik.
öncül dizi Proteinleri mitokondriye yönlendiren bir amino-uç dizisi.
öncül hücre duvarı Büyüyen bitki hücrelerinin duvarları.
östrojen Yumurtalıklarda üretilen bir steroid hormon.

P

P1 yapay kromozomu (PAC) Uzun DNA parçalarının *E. coli*'de klonlanması için kullanılan bir vektör.
p53 DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünü G_1 evresinde durduran ve çeşitli uyaranlarla uyarılan apoptoz için gerekli olan bir transkripsiyon faktörü (*p*53 tümör baskılayıcı gen tarafından kodlanır).
pakiten Homolog kromozomlar arasında rekombinasyonun gerçekleştiği mayoz I evresi.
palmitoillenme Bir polipeptid zincirindeki sisteine palmitik asit (16 karbonlu bir yağ asiti) eklenmesi.

papillomavirus İnsanlarda bazı tipleri servikal ve bazıları anogenital kanserlere neden olan DNA virüsleri ailesinin bir üyesi.

parakrin sinyal iletimi Bir hücreden salınan molekülün komşu hedef hücreleri etkilediği, hücreden hücreye lokal sinyal iletimi.

paralel demet Paralel bir şekilde birbirine oldukça yakın dizilmiş aktin filamentlerini içeren bir tür aktin demeti.

pasif transport Moleküllerin bir membrandan enerjetik olarak elverişli yönde taşınması.

pektin Bitki hücre duvarındaki bir, jel-oluşturan polisakkarid.

peptid bağı Polipeptid zincirlerinde amino asitleri birbirine bağlayan bağ.

peptid hormon Amino asitlerden oluşan sinyal molekülü.

peptidil prolil izomeraz Prolil peptid bağlarında *cis-trans* izomerleşmesini katalizleyerek, protein katlanmasını kolaylaştıran enzim.

peptidoglikan Kısa peptidlerle çapraz bağlanmış doğrusal polisakkarid zincirlerinden oluşan, bakteri duvarı ana bileşeni.

periferal zar proteinleri Hücre zarlarına, protein-protein ilişkileriyle, dolaylı olarak bağlanan proteinler.

perisentriolar materyal Sentrozomlarda mikrotübül yapılanmasını başlatan materyal.

peroksizom biyogenez hastalığı Peroksizom yapılanmasından sorumlu Pex proteinlerinden birinde meydana gelen bir mutasyon sonucu oluşan hastalık.

peroksizom Oksidatif reaksiyonları yürütmek üzere özelleşmiş bir sitoplazmik organel.

Pex protein Peroksizom yapılanmasında rol alan bir peroksizom transmembran proteini.

photo-merkez Kloroplastların tilakloid membranlarında fotosentetik pigmentlerin toplanması.

PI 3-kinaz Bkz. fosfotidilinozitid (PI) 3-kinaz.

pirimidin dimeri UV ışığının neden olduğu, komşu pirimidinlerin birleşerek dimer oluşturdukları yaygın bir DNA hasarı formu.

pirimidin Nükleik asitlerde bulunan baz tiplerinden biri. Pirimidinler sitozin, timin ve urasildir.

plakin Ara filamanları diğer hücresel yapılara bağlayan proteinler ailesinin bir üyesi.

plastid Kloroplastları, kromoplastlan, lökoplastları, amiloplastları ve elayoplastları içeren bitki organelleri ailesi.

platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF) Kan pıhtılaşması sırasında, fibroblastların çoğalmasını başlatmak üzere trombositlerden salgılanan bir büyüme faktörü.

plazma zarı Hücreyi çevreleyen, protein içeren fosfolipid çift tabaka.

plazmalojen Bir eter ve bir ester bağı içeren fosfolipid ailesi.

plazmid Konakçı hücrede bağımsız replike olabilen küçük, çembersel DNA molekülü.

plazmodesma Bitişik bitki hücreleri arasında, aralıksız plazma zar bölgesinin oluşturduğu sitoplazmik bağlantı.

pluripotentlik Yetişkin doku ve organlarındaki tüm farklı hücre tiplerine dönüşebilme kapasitesi.

PML / RARα Akut promiyelosiyitik lösemide retinoik asit reseptörünün translokasyonuyla oluşan bir onkogen.

polar cisim Oosit mayozunu takiben, asimetrik hücre bölünmesiyle oluşan küçük hücre.

poli-A kuyruğu Ökaryot mRNA'larının 3′ ucuna eklenmiş, yaklaşık 200 adenin nükleotidlik dizi.

poliadenillenme Bir pre-mRNA'ya poli-A kuyruğu takma işlemi.

polikomb cisim Polikomb proteinlerce zenginleştirilmiş nükleer bir cisim.

polikomb proteinler Histon H3 lizin 27'yi metilleyen bir represör protein kompleksi.

polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) Bir DNA bölgesinin, *in vitro* ortamda tekrarlanan DNA replikasyon döngüleriyle amplifikasyonu yöntemi.

polinükleotid Milyonlarca nükleotid içeren bir polimer.

polip Bir epitel yüzeyinden çıkan selim bir tümör.

polipeptid Amino asit polimeri.

polisakkarit Yüzlerce ya da binlerce şeker içeren bir polimer.

polisistronik Çok sayıda polipeptid zinciri kodlayan mRNA'lar.

polizom Bir mesajcı RNA'yı proteine çeviren ribozomlar dizisi.

polo-benzeri kinaz Mitotik iğ oluşumu, kinetokor fonksiyonu ve sitokinez ile ilişkili bir protein kinaz.

polyomavirüs Yaygın-çalışılan DNA tümör virüsü.

porin Zarları β-fıçıları şeklinde kat eden ve bazı bakterilerin, mitokondrilerin ve kloroplastların dış zarlarında kanallar oluşturan protein grubunun bir üyesi.

pre-mRNA Ökaryot hücrelerde işlenerek, mesajcı RNA'ları oluşturan öncül transkript.

prenillenme Polipeptid zincirinin C ucu sistein birimlerine özel tip lipidlerin (prenil grupları) eklenmesi.

pre-rRNA Kesilerek her bir ribozomal RNA'yı (ökaryot; 28S, 18S ve 5.8S rRNA'ları) oluşturan öncül transkript.

pre-tRNA Taşıyıcı RNA'ları oluşturmak üzere kesilen öncül transkript.

primaz DNA sentezinin başlatılmasında kullanılan bir RNA polimeraz.

primer kültür Bir doku oluşturulan başlangıç hücre kültürü.

prion Kendini replike etme yeteneği olan yanlış katlanmış bir protein.

profaz Mitozda, yoğunlaşmış kromozomların belirmesi ve mitotik iğin oluşması ile belirlenen başlangıç evresi.

profilin Aktin monomerlerinin filamanları oluşturmak üzere bir araya gelmelerine uyaran bir aktine-bağlanan protein.
progesteron Yumurtalıklarda üretilen bir steroid hormon.
programlı hücre ölümü Apoptoz olarak tanımlanan, normal fizyolojik hücre ölüm tarzı.
prokaryot hücreler Nükleer zarfı, sitoplazmik organelleri ve hücre iskeleti bulunmayan bir hücreler (bakteriler).
prokollajenler Fibril-oluşturan kollajenlerin çözünür öncülleri.
prometafaz Profaz ile metafaz arasında, mitoz iği mikrotübüllerinin kinetokorlara tutunduğu ve kromozomların, hücrenin merkezinde dizilmek üzere karıştıkları, geçiş dönemi.
promotör RNA polimerazın transkripsiyonu başlatmak üzere bağlandığı DNA dizisi.
pronükleus Yeni döllenen yumurtadaki iki haploid çekirdekten bir.
proplastid Çeşitli olgun plastidlere dönüşebilen farklılaşmamış küçük bir organel.
prostaglandin Yangı sinyali iletimiyle ilişkili bir ekosanoid lipid ailesi.
prostasiklin Prostaglandin H_2'den oluşan bir ekosanoid.
prostetik gruplar Proteine bağlı bir küçük molekül.
proteazom Übikütin bağlanmış proteinleri yıkan, büyük bir proteaz kompleksi.
protein disülfid izomeraz Disülfid (S-S) bağlantılarının oluşmasını ve kırılmasını katalizleyen enzim.
protein fosfataz Fosforillenmiş amino asit birimlerinden fosfat gruplarını uzaklaştırarak, protein kinazların etkisini geri çeviren bir enzim.
Protein hatalı-katlanma hastalığı Kusurlu protein katlanması sonucu oluşan bir hastalık.
protein Kendine has amino asit dizisine sahip bir polipeptid.
protein kinaz A Siklik AMP tarafından düzenlenen bir protein kinaz (cAMP bağımlı protein kinza olarak da adlandırılır).
protein kinaz ATP'den bir fosfat grubu transfer ederek proteinleri fosforilleyen bir enzim.
protein kinaz C Diaçilgliserol ve Ca^{2+} tarafından aktive edilerek hücre içi sinyal iletiminde rol oynayan bir protein-serin /treonin kinaz ailesi.
proteoglikan Glikozaminoglikanlara bağlı bir protein.
proteoliz Polipeptid zincirlerinin yıkımı.
proteome Belirli bir hücrede eksprese olan bütün proteinler.
proteomik Hücresel proteinlerin büyük ölçekli analizi.
proto-onkogen Bir onkogene dönüştürülebilen normal bir hücresel gen.
psödogen İşlevsiz gen kopyası.
psödopod Fagositozla ve amipsi hareketten sorumlu, aktin temelli plazma zarı uzantısı.
PTEN PIP_3'ü defosforile eden ve tümör baskılayıcı olarak davranan bir lipid fosfataz.
pürin Nükleik asitlerde bulunan baz tiplerinden biri. Pürinler adenin ve guanindir.

R

Rab Vezikül taşınmamda anahtar rol oynayan, küçük, GTP- bağlayan bir proteinler ailesi.
Rad51 RecA'nın ökaryotik homoloğu.
raf Raf proteinlerini kodlayan gen.
Raf Ras tarafından aktive edilen ve ERK MAP kinazın aktivasyonuna yol açan bir protein-serin/treonin kinaz (raf onkogeni tarafından kodlanır).
Ran Çekirdek içine alma ve dışarı gönderme işlemlerinde görevli, GTP-bağlayan küçük bir protein.
Ras Büyüme faktörü reseptörlerini, ERK MAP kinaz ve protein-serin / treonin kinaz yolaklarını da kapsayan hücre içi hedeflerle ilişkilendiren, küçük GTP-bağlayan proteinler ailesi.
ras Ras proteinini kodlayan gen.
Rb Rb proteinini kodlayan bir tümör baskılayıcı gen.
Rb Retinoblastomların genetik analizi ile tanımlanmış olan bir tümör supressör genden kodlanan ve hücre döngüsünün ilerlemesini denetleyen bir transkripsiyon düzenleyici protein.
RecA Rekombinasyon sırasında, homolog DNA molekülleri arasında iplik değişimini sağlayan protein.
rekombinant DNA kütüphanesi Genomik veya cDNA klon koleksiyonu.
rekombinant molekül Vektöre takılan DNA eki.
rekombinasyonel onarım Hasarlı DNA'nın, haasarlanmamış homolog DNA ile rekombinasyon yoluyla onarımı.
replikasyon çatalı Atasal ipliklerin birbirinden ayrıldığı ve yeni iki ipliğin sentezlendiği DNA sentez bölgesi.
replikasyon fabrikası Ökaryotik hücrelerde kümelenmiş DNA replikasyon bölgelerini içeren büyük bir kompleks.
replikasyon orijini Replikasyonu başlatan proteinler için bir bağlanma bölgesi olarak görev yapan spesifik bir DNA dizisi.
reprodüktif klonlama Klonlanmış organizma elde etme amaçlı nükleer transfer.
reseptör olmayan protein-tirozin kinaz Bir hücre içi protein-tirozin kinaz.
reseptör tirozin kinaz Ekstraselüler ligandlar için bir reseptör olan membrane-geçişli bir tirozin kinaz.
restriksiyon endonükleaz DNA'yı özgül bir diziden kesen bir enzim.
restriksiyon haritası DNA molekülü üzerinde restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinin yerleşimi.

restriksiyon noktası Hayvan hücre döngüsünde geç G_1'de bulunan bir düzenleyici nokta. Bu noktayı geçen hücre, S'ye girmek ve bir hücre bölünmesi geçirmek zorundadır.

retinoid Retinoik asitle ilgili bir molekül.

retinoik asit Vitamin A' dan sentezlenen bir sinyal molekülü.

retrotranspozisyon Bir aracı RNA'nın ters transkripsiyonu ile yer değiştirebilen (transposable) elemanların hareketi.

retrotranspozon Bir RNA ara ürünün ters transkripsiyonu yoluyla hareket ederek yer değiştirebilen (transposable) bir eleman.

retrovirus RNA genomundan ters transkripsiyon ile DNA kopyasını oluşturarak çoğalan bir virüs.

retrovirüs-benzeri eleman Yapısal olarak retrovirusa benzeyen bir retrotranspozon.

revers transkriptaz RNA'yı kalıbı 0larak kullanan bir DNA polimeraz.

Rezolüsyon/çözünürlük Mikroskobun küçük mesafeler ile ayrılan nesneleri ayırt edebilme yeteneği.

Rho Hücre iskeletinin düzenlenmesinde görev alan küçük, GTP-bağlayan bir proteinler ailesi.

ribonükleik asit (RNA) Bir ribonükleotid polimeri.

riboz RNA'da bulunan beş karbonlu bir şeker.

ribozim RNA enzim.

ribozom RNA ve proteinlerden oluşan ve proteinlerin sentez yeri olan partikül.

ribozomal RNA (rRNA) Ribozomların RNA bileşeni.

riyanodin reseptörleri Kas ve sinir hücrelerinde bulunan ve zar potansiyeli değişikliklerine yanıt olarak açılan kalsiyum kanalları.

RNA dünyası Kendi kendine replike olabilen RNA molekülleri üzerine kurulu, erken evrim aşaması.

RNA düzeltme Mesajcı RNA'ların protein kodlayan dizilerini değiştiren, kesip-ekleme (splicing) dışındaki RNA işlenmesi olayı.

RNA interferens (RNAi) Mesajcı RNA'ların, kısa komplementer çift-iplikli RNA molekülleri tarafından yıkılması.

RNA kesip-eldeme (splicing) Öncü RNA molekülünde ekzonların birleştirilmesi.

RNA polimeraz RNA sentezini katalizleyen bir enzim.

RNA-seq RNA'ların yeni nesil dizileme ile global analizi.

RNaz H RNA-DNA hibrid moleküllerinde RNA ipliğini yıkan enzim.

RNaz P Pre-tRNA'ların 5' ucunu kesen bir ribozim.

rodopsin Retinadaki çubuk hücrelerde bulunan ve ışık absorbsiyonu sonucunda transdusini aktive eden, G-proteini-eşlikli bir fotoreseptör.

Rous sarkom virüsü (RSV) İlk onkogenin saptanmış olduğu, akut transforme eden retrovirus.

rRNA Bkz. ribosomal RNA

S

S evresi DNA replikasyonunun gerçekleştiği hücre döngüsü evresi.

Saccharomyces cerevisiae Sık çalışılan bir tomurcuklanan maya.

sağaltıcı klonlama Transplantasyon sağaltımı amacıyla kullanılmak üzere embriyonik kök hücre oluşturmaya yönelik, oositlere nükleus aktarımının kullanılabildiği yöntem.

salgı vezikülü Proteinleri golgi aygıtından hücre yüzeyine taşıyan, zarla çevrili bir kese.

salgı yolağı Salgılanan proteinlerin endoplazmik retikulumdan Golgi aygıtına ve oradan da, salgı vezikülleri aracılığıyla hücre yüzeyine hareketi.

salıverme faktörü Dur kodonlarını tanıyarak mRNA'nın translasyonunu sonlandıran protein.

santral (ana) dogma Genetik bilginin, DNA'dan RNA'ya, RNA'dan proteine doğru tek yönde aktığı şeklindeki görüş.

sarkom Bağ dokusu hücrelerinin bir kanseri.

sarkomer Kas hücrelerinde birbiriyle bağlantılı miyozin ve aktin filamanlarının oluşturduğu kasılan birim.

sarkoplazmik retikulum Kas hücrelerinni içinde zarlarının oluşturduğu, yüksek konsantrasyonda Ca^{2+} depolayan özel bir ağ yapısı.

sarmal-dönüş-sarmal Bir transkripsiyon faktörünün, DNA ile temas eden üç ya da dört sarmal bölümden oluşan DNA-bağlanma bölgesi.

sarmal-ilmik-sarmal Bir transkripsiyon faktörünün, iki polipeptid zincirinin dimerleşmesiyle oluşan DNA'ya bağlanma bölgesi. Bu proteinlerin dimerleşme bölgeleri, bir ilmek ile ayrılmış iki sarmal yapı içerir.

satellit DNA Yüksek yoğunluğu ile geri kalan DNA'dan ayrılan basit dizili tekrarlayan DNA.

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Proteinleri jel elektroforezi ile büyüklüklerine göre ayırmada sıklıkla kullanılan bir metod.

selektin Hücre yüzeyinde sergilenen oligosakkaridleri tanıyan hücre adezyon molekülü.

sellüloz Bitki hücre duvarının temel yapısal bileşenidir, $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidik bağlarıyla bağlı glukoz monomerlerinden oluşan, doğrusal bir polimerdir.

sellüloz sentaz Selüloz sentezini katalizleyen enzim.

sentetik biyoloji Yeni biyolojik sistemler tasarlamak ve yaratmak için kullanılan bir mühendislik yaklaşımı.

sentriol Hayvan hücrelerinin çoğunda sentrozomların içerisinde yer alan, dokuz mikrotübül üçlüsünden oluşmuş, silindir biçimindeki yapı.

sentromer Kardeş kromatidleri birbirine bağlayan ve mitotik iğe tutunmalarını sağlayan özelleşmiş bir kromozom bölgesi.

sentrozom Hayvan hücrelerindeki mikrotübül düzenleyen merkez.

serin treonin kinaz serin ve treonin kalıntılarını fosforilleyen bir protein kinaz.

serum yanıt elemanı (SRE) Serum yanıt faktörü tarafından tanınan ve büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak bir çok acil erken genlerin transkripsiyonunun başlamasına aracılık eden bir düzenleyici dizin.

serum yanıt faktörü (SRF) Serum yanıt elemanına bağlanan bir transkripsiyon faktörü.

sfingomiyelin Serin içeren polar bir baş grubuna bağlı iki hidrokarbon zinciri içeren fosfolipid.

SH2 bölgesi Fosfotirozin içeren peptidlere bağlanan, yaklaşık 100 amino asitlik bir protein bölgesi.

Shine-Dalgarno dizisi Bakteri mRNA'larının ribozom üzerine uygun yerleşimini sağlayan, başlama noktasından önceki bir dizi.

sıkı bağlantı Epitel hücrelerin çevresinde, hücreler arası alanı kapatan ve apikal ve bazolateral bölgeler arasında engel sağlayan, protein ipliklerinin oluşturduğu kesintisiz bir ağ yapısı.

SINE'ler (serpiştirilmiş kısa elemanlar) Memeli genomlarında, yüksek oranda tekrarlanan bir retrotranspozon ailesi.

sınıf değiştirme rekombinasyonu Yeniden düzenlenen immünoglobülün V(D)J bölgeleri ile farklı ağır zincir sabit bölgelerinin ilişkisinden sorumlu bir çeşit bölge-spesifik rekombinasyon

siklik AMP (cAMP) Fosfat grubu 3′ ve 5′ karbon atomlarının her ikisine kovalent bağlanarak, halkasal bir yapı oluşturmuş adenozin monofosfat; hücrelerin çeşitli hormonlara yanıtında önemli bir ikinci mesajcı.

siklik GMP (cGMP) Fosfat grubu 3′ ve 5′ karbon atomlarının her ikisine kovalent bağlanarak, halkasal bir yapı oluşturmuş guanozin monofosfat; hücrelerin çeşitli hormonlara yanıtında ve görmede önemli bir ikinci mesajcı.

siklin Cdk'ların aktivitesini düzenleyerek hücre döngüsünde ilerlemeyi kontrol eden bir protein ailesi.

simian virüs 40 (SV40) Yaygın çalışılan bir DNA tümör virüsü.

simport Bir zardan iki molekülün aynı yönde taşınması.

sinaps Bir nöron ile diğer bir hücre arasında, nörotransmitterlerle bilginin iletildiği kavşak.

sinapsis Mayoz sırasında homolog kromozomlar arasındaki bağlantı.

sinaptik vezikül Sinaps bölgesinde nörotransmitterleri serbest bırakan salgı vezikülü.

sinaptonemal kompleks Mayoz sırasında eşleşen homolog kromozomlar arasında boydan boya oluşan, fermuar benzeri protein yapı.

sinir büyüme faktörü (NGF) Nöronların gelişimini ve sürekliliğini düzenleyen bir polipeptid büyüme faktörü.

sinyal ağı Bir hücre içindeki, çok sayıda sinyal yolağının etkileşimi ile oluşan birbirleri ile bağlantılı ağ.

sinyal dizisi Polipeptid zincirinin amino ucunda bulunan ve bakteride salgılanmasını, ökaryot hücrede ise endoplazmik retikuluma alınmasını hedefleyen hidrofobik dizi.

sinyal peptidaz Bir polipeptid zincirinin sinyal dizisini proteoliz ile uzaklaştıran enzim.

sinyal tanıma partikülü (SRP) Proteinler ile srpRNA'dan oluşan ve sinyal dizilerine bağlanarak polipeptid zincirlerini endoplazmik retikuluma taşıyan partikül.

sinyal yaması Polipeptid zincirinin üç boyutlu katlanmasıyla oluşan bir tanınma işareti.

siRNA Bkz. kısa interfere edici RNA

sistem biyolojisi Karmaşık biyolojik sistemlerin çalışılması için, büyük ölçekli deneysel yaklaşımlar ile kantitatif analiz ve modellemenin birlikte kullanıldığı, biyolojinin yeni bir alanı.

sitokalasin Aktin filamanlarının uzamasını durduran bir ilaç.

sitokin Kan hücrelerini ve lenfositleri denetleyen büyüme faktörü.

sitokin reseptörü süper ailesi Hücre içinde protein-tirozin kinaz aktivitesini uyaran bir hücre yüzeyi reseptör ailesi.

sitokinez Mitoz veya mayozu izleyen hücre bölünmesi.

sitokinin Hücre bölünmesini denetleyen bir bitki hormonu.

sitokrom *bf* kompleksi Tilakoid zarda bulunan ve fotosentez sürecinde elektronları taşıyan bir protein kompleks.

sitokrom *c* Oksidatif fosforilasyon sürecinde elektronları taşıyan, mitokondri zarındaki bir periferal protein.

sitokrom oksidaz Elektron taşıma sisteminde yer alan ve elektronları sitokrom c'den alıp O_2'ye aktaran bir protein kompleks.

sitoplazmik dinein Sitoplazmadaki mikrotübüllerle ilişkili dinein çeşidi.

sitostatik faktör (CSF) Oosit mayozunu metafaz II'de durduran bir sitoplazmik faktör.

sitozin Guanin ile baz eşleşmesi oluşturan bir pirimidin.

sitrik asit döngüsü Asetil CoA'nın CO_2'ye oksitlendiği bir dizi reaksiyon. Oksidatif metabolizmanm ana yolağı.

siyanobakteriler Fotosentez evriminin kökeninde yer aldığı düşünülen, en büyük ve en karmaşık prokaryotlar.

Smad TGF-β reseptörleri tarafından aktive edilen bir transkripsiyon faktörü ailesi.

SNARE Vezikül ve hedef membranların füzyonuna aracılık eden bir transmembran protein.

Somatik hipermutasyon Antikor çeşitliliğini arttırmak için, yeniden yapılanan immunglobin değişken bölgelerinde oluşturulan çoklu mutasyonlar.

somatik hücre çekirdek nakli Hayvan klonlamada, yetişkin bir somatic hücre çekirdeğinin çekirdeksiz bir yumurtaya transfer edildiği temel bir yöntem.
Southern blotlama Radyoaktif ya da floresan işaretli problar kullanılarak, jel elektroforezi ile ayrılan spesifik DNA fragmanlarını belirlemek için kullanılan yöntem.
spektrin Hücre korteksinde en önemli, aktin-bağlayan protein.
splisozom Pre-mRNA'ların kesilip-eklenerek (splicing) işlenmesini katalizleyen, snRNA'lar ile proteinlerden oluşmuş büyük bir kompleks.
src 1. Src proteinini kodlayan gen. 2. Raus sarcoma virüs onkogeni
Src Rous sarkom virüsü onkogeni (*src*) tarafından kodlanan bir non-reseptör protein-tirozin kinaz.
SRP reseptörü Endoplazmik retikulum zarında bulunan ve sinyal tanıyan partiküle (SRP) bağlanan bir protein.
SRP RNA SRP'nin küçük sitoplazmik RNA bileşeni.
START Maya hücre döngüsünde geç G_1'de yer alan bir düzenleme noktası. Bu noktayı geçen hücre, S evresine girmeye ve bir kez bölünmeye koşullanmıştır.
STAT proteinler SH2 bölgesine sahip olup tirozin fosforilasyonu ile aktive olarak sitoplazmadan nükleusa geçebilen bir transkripsiyon faktörü.
steroid hormon Östrojen ve testesteronu içeren, kolesterol türevi bir grup hidrofobik hormon.
steroid hormon reseptörü Steroid hormonlara yanıt olarak gen ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü.
sterosil İşitme tüy hücrelerinde bulunan özel bir mikrovilus.
stres lifi Hücrenin hücre-dışı matrikse yapıştığı bölgelere tutunan bir aktin filamanları demeti.
stroma Kloroplastlarda zarf ile tilakoid zarlar arasında yer alan bölme.
stromal işlemci peptidaz (SPP) Kloroplast stromasına alınan proteinlerin geçiş peptidlerini kesen proteaz.
substrat Enzim tarafından etkilenen bir molekül.
SUMO Küçük übikütin-ilişkili değiştirici. Protein aktivitesini düzenleyen ve protein lokalizasyonu için bir işaret olarak iş gören bir übikütin-benzeri protein.
süper çözünürlüklü ışık mikroskopi Işık mikroskobu difraksiyon bariyerini kıran ve floresan mikroskobunun çözünürlüğünü 10-100 nm'ye kadar arttıran yeni teknikler.

Ş

şaperon Başka proteinlerin doğru katlanmasına ya da bir araya gelmelerine yardım eden protein.

T

T hücre reseptörü Diğer hücrelerin yüzeyinde sergilenen antijenleri tanıyan, bir T lenfositi yüzey proteini.
taksol Mikrotübüllere bağlanan ve stabilize eden bir ilaç.
talin Fokal adezyon bölgelerinde aktin filamanlarının integrinler ile etkileşimine aracılık eden bir protein.
tarama elektron mikroskopisi Bkz. elektron mikroskopi.
taşıyıcı proteinler Küçük moleküllere seçici olarak bağlanıp, zardan geçmelerini sağlayan proteinler.
TATA kutusu RNA polimeraz II ile transkribe olan ökaryot genlerinin çoğunun genomunda bulunan düzenleyici DNA dizisi.
TATA-bağlanan protein (TBP) Direkt olarak TATA kutusuna bağlanan bazal transkripsiyon faktörü.
TBP-bağlanan faktör (TAF) Genel transkripsiyon faktörü TFIID'de TBP ile birleşen polipeptidler.
Tek-iplikli DNA bağlayan protein Tek iplikli bölgelere bağlanarak, açılmış DNA'yı stabilize eden bir protein.
telofaz Mitozda, kromozomların dağıldığı ve nükleusun yeniden oluştuğu son evre.
telomeraz Kromozom uçlarındaki tekrar dizilerini kendi RNA kalıbı üzerinden sentezleyen bir revers transkriptaz.
telomerler Doğrusal kromozomların uçlarını koruyan, basit DNA dizisi tekrarları.
ters transkripsiyon Bir RNA kalıbından DNA sentezlenmesi.
testosteron Testisten üretilen bir steroid hormon.
Tic kompleksi Kloroplast iç zarında bulunan, protein-yer değiştirme kompleksi.
tilakoid zar Kloroplastlarda, elektron taşınmasının ve ATP üretiminin gerçekleştiği en içteki zar.
Tim kompleksi Mitokondri iç zarında bulunan, protein-yer değiştirme kompleksi.
timin DNA'da bulunan ve adenîn ile eşleşen bir pirimidin.
tiroid hormonu Tiroid bezinde tirozinden sentezlenen bir hormon.
tirozin kinaz Tirozin kalıntılarını fosforilleyen bir protein kinaz.
Toe kompleksi Kloroplast dış zarında bulunan, protein-yer değiştirme kompleksi.
Toll-benzeri reseptör Patojenik bakteri ve virüsler ile ilişkili çeşitli molekülleri tanıyan bir reseptör ailesi üyesi.
Tom kompleksi Mitokondri dış zarında bulunan, protein-yer değiştirme kompleksi.
topoizomeraz DNA ipliklerinin geri dönüşümlü kesilip yeniden birleşmesini katalizleyen bir enzim.
***trans* Golgi ağı** Proteinlerin Golgi'yi terk etmek üzere gruplandırılıp paketlendikleri golgi bölgesi.
transdiferansiasyon Bir tip somatik hücrenin, bir diğer farklılaşmış hücre tipine farklılaşması.
transdüsin Rodopsin tarafından aktive edilince cGMP fosfodiesteraz'ı uyaran bir G proteini.
transfeksiyon Ökaryot hücreye yabancı bir genin sokulması.

transfer RNA (tRNA) Protein sentezi sırasında mRNA ile amino asitler arasında adaptör olarak işlev gören bir RNA molekülü.
transferine edici büyüme faktörü β(TGF-β) Genellikle hayvan hücresi çoğalmasını baskılayan bir polipeptid büyüme faktörü.
transformasyon Genetik olarak farklı bakteriler arasında DNA transferi. Bkz. Hücre transformasyonu
transgenik fare Germ hattma eklenen yabancı genleri taşıyan bir fare.
transit peptid Proteinleri kloroplastların içine alınmak üzere hedefleyen N-ucu dizi.
Transkripsiyon aktivatörleri Transkripsiyonu uyaran transkripsiyon faktörleri.
transkripsiyon Bir DNA kalıbı üzerinden RNA molekülü sentezlenmesi.
transkripsiyon fabrikası Çekirdek içerisinde pek çok genin transkripsiyonunun oluştuğu kümelenmiş bölge.
transkripsiyon faktörü RNA polimerazın aktivitesini düzenleyen bir protein.
transkripsiyon-eşlikli onarım DNA'nm kopyalanan ipliğindeki hataların öncelikli olarak onarılması.
transkriptom Bir hücrede transkribe olan tüm RNA'lar.
translasyon Bir mRNA kalıbından polipeptit zinciri sentezi.
translezyon DNA sentezi Bir DNA hasarı bölgesinin, özelleşmiş DNA polimerazlar ile replike edilerek geçildiği bir tamir türü.
translokon Polipeptid zincirlerinin, içerisinden geçerek endoplazmik retikuluma aktarıldıkları zar kanalı.
transmembran proteinler Lipid çift tabakayı kat eden ve zarın her iki yanında açık kısımları bulunan, integral zar proteinleri.
transmisyon elektron mikroskopisi Bkz. elektron mikroskopi.
triaçilgliserol Üç yağ asidi bağlanmış bir gliserol molekülü.
tRNA Bkz. transfer RNA
tromboksan Kan pıhtılaşmasında rol oynayan bir ökosanoid.
tropomiyozin Aktin filamanlarına bağlanan ve aktin ile miyozin ilişkisini engelleyerek kasılmayı denetleyen bir fibroz protein.
troponin Aktin elamanlarına bağlanarak iskelet kasının kasılmasını düzenleyen bir protein kompleksi.
turgor basıncı Bitki hücrelerinin içerisindeki iç hidrostatik basınç.
tübülin Mikrotübülleri oluşturmak üzere polimerleşen bir hücre iskelet proteini.
tümör baskılayıcı gen İnaktivasyonu tümör gelişimine neden olan gen.
tümör başlangıcı (inisiyasyon) Tümör gelişiminin, tek bir hücrenin anormal çoğalmasıyla sonuçlanan ilk aşaması.
tümör Hücrelerin, her türlü, anormal çoğalması.
tümör ilerlemesi (progresyon) Bir tümör popülasyonunu oluşturan hücrelerde mutasyonların birikmesi ve bunun sonucunda hızlı bölünme artışı ve malignansi.
tümör kamçılayıcı Hücre çoğalmasını uyararak tümör gelişimine yol açan bir bileşik.
tümör nekroz faktörü (TNF) İnflamasyonu ve programlı hücre ölümünü indükleyen bir polipeptid büyüme faktörü.
tümör virüsü Hayvanlarda veya insanda kansere neden olabilen virüs.

U

ubikinon Bkz. coenzim Q.
ubikütin Hücresel proteinleri hızlı yıkım için belirleyen yüksek oranda korunmuş bir protein.
ultrasantrifüj Örnekleri yüksek hızda döndüren bir santrifüj.
uniport Tek bir molekülün zardan geçişi.
urasil RNA'da bulunan, adenin ile eşleşen bir pirimidin.
uzama faktörü Transkripsiyon ya da translasyonun uzama evresinde rol alan bir protein.
uzun kodlamayan RNA (lncRNA) Gen ekspresyonunu düzenleyen, 200 nükleotidden daha uzun RNA.

Ü

üçüncül yapı Bir polipeptidin, proteine işlevsel şeklini vermek üzere, üç boyutlu katlanmış hali.
ürün Bir enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan bileşik.

V

vakuol Ökaryot hücrelerin sitoplazmasındaki, zarla-çevrili büyük kese. Bitki hücrelerinde vakuoller; besin ve artık depolama, makromolekül yıkımı ve turgor basıncını koruma görevlerini yerine getirir.
vektör Klonlanmış bir DNA parçasının konakçı hücrede replikasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan DNA molekülü.
video ile güçlendirilmiş mikroskopi Küçük objeleri görünür kılabilmek için video kameralarının ışık mikroskobuyla birlikte kullanılması.
villin Bağırsak mikroviluslarında en önemli aktin-demetleyen protein.
vimentin Çeşitli, farklı hücre tiplerinde bulunan bir ara filaman proteini.
vinblastin Mikrotübül polimerleşmesini baskılayan bir ilaç.
vinkristin Mikrotübül polimerleşmesini baskılayan bir ilaç.
vinkulin Fokal bağlantılarda aktın filamanlarınnın integrinlerle etk,leşmesini sağlayan bir protein.
vitamin D3 Kalsiyum metabolizması ve kemik büyümesini, nükleer reseptör süper ailesinden bir üyenin aktivitesini uyararak, düzenleyen bir vitamin.

voltaj-kapılı kanal Elektrik potansiyel değişikliklerine yanıt olarak açılan iyon kanalları.

W

WASP Aktin filament dallanmasını uyaran bir protein

Western blot Bkz. Immünblotlama.

Wnt Embriyonik gelişim sürecinde hücrenin kaderini düzenleyen bir yolağı uyaran, salgılanan bir sinyal molekülü.

X

Xenopus laevis Gelişim biyolojisinde bir model sistem olarak kullanılan, Afrika pençeli kurbağası.

X-ışını kristallografisi Bir moleküldeki her bir atomun düzeninin belirlenmesinde, X-ışını yansıma desenlerini kullanan bir yöntem.

X-kromozom inaktivasyonu Dişi hücrelerde, X kromozomlarından birinin üzerindeki genlerin çoğunun inaktivasyonu şeklindeki, dozaj ayarlama mekanizması.

Y

yağ asitleri Genellikle bir karboksil (COO-) grubuna bağlı, uzun hidrokarbon zincirleri.

yağlar Bkz. triaçilgliseroller.

Yalıtkan (insulator) Kromatinleri birbirinden bağımsız bölgelere ayıran ve bir güçlendiricinin başka bir bölümünde bulunan bir promotöre etki etmesini engelleyen bir dizi.

yapı iskelet (scaffold) proteinleri Sinyal ileti yolağı bileşenlerine bağlanarak, özgül sinyal kasetleri şeklinde düzenleyen proteinler.

yarı korunumlu replikasyon İki atasal ipliğin açılıp yeni yavru ipliklerin sentezi için kalıp oluşturduğu DNA replikasyonu işlemi.

Yeni nesil dizileme Milyarlarca DNA bazının hızlıca dizilenmesine olanak sağlayan yeni metodlardır.

yer değiştirebilen eleman (*transposable element*) Genom içerisinde farklı pozisyonlara hareket edebilen bir DNA dizisi.

yeşil floresan protein (GFP) Denizatından elde edilen ve floresan mikroskopta belirleyici olarak kullanılan bir protein.

yıldızsı (astral) mikrotübül Hücrenin periferine uzanan bir mitotik iğ mikrotübülü.

yoğunluğa-bağlı inhibisyon Kültürdeki normal hücrelerin çoğalmalarının, sınırlı bir hücre yoğunluğunda durması.

yoğunluk gradienti santirfügasyonu Sükroz veya sezyum klorid gibi yoğun bir maddenin gradienti içerisinden santirfüjleyerek, partikülleri ayırma yöntemi.

yüksek-enerji bağı Hidrolize olduklarında yüksek miktarda serbest enerji açığa çıkaran kimyasal bağı.

yürüme (treadmilling Aktin filamanları ve mikrotübül alt birimlerinin, flamanın bir uçtan eksilmesinin diğer uçtan eklenmesiyle dengelendiği dinamik bir davranış.

Z

zarlara-tutunmuş büyüme faktörü Hücre-hücre bağlantılarında bir sinyal ileti molekülü olarak görev yapan, plazma membrane ile ilişkili bir büyüme faktörü.

zebrabalığı Omurgalı gelişiminin genetik araştırmalarında kullanılan küçük bir balık türü.

zigot Döllenmiş bir yumurta.

zigoten Homolog kromozomların yakın etkileşimde olduğu mayoz I evresi.

Şekiller/Fotoğraflar İçin Atıflar

Bölüm 1

1.5: © Biophoto Associates/Science Source. **1.8:** © Medical on-Line/Alamy. **1.9A:** © M. I. Walker/Science Source. **1.9B:** © Aaron J. Bell/Science Source. **1.11B:** © David Scharf/ Science Source. **1.12A:** © Dr. Ken Wagner /Visuals Unlimited, Inc. **1.12B:** © Phil Gates/Biological Photo Service. **1.12C:** © Alfred Owczarzak/Biological Photo Service. **1.12D:** © J. Robert Waaland/Biological Photo Service. **1.13A(i):** © G. W. Willis/Visuals Unlimited, Inc. 1.13A(ii): © G. W. Willis /Visuals Unlimited, Inc. **1.13A(iii):** © Carolina Biological Supply Com pany/Visuals Unlimited, Inc. **1.13B:** © Biophoto Associates/ Science Source. **1.13C:** © G. W. Willis/Visuals Unlimited, Inc. **1.14:** © A.M. Siegelman/Visuals Unlimited, Inc. **1.15:** © Biophoto Associates/Science Surce. **1.17, 1.18, 1.20B:** David Mcintyre. **1.23:** © destillat/istock. **1.24:** © G. W. Willis/Visu als Unlimited, Inc. **1.27B:** © Conly L. Rieder/Biological Photo Service. **1.32:** © © Dr. Torsten Wittmann/Science Source. **1.34:** © Don W. Fawcett/Visuals Unlimited, Inc. **1.36:** © Don W. Fawcett, J. Heuser/Science Source. **1.37B:** © Don W. Fawcett/ Science Source. **1.38:** © David Phillips/Visuals Unlimited, Inc. **1.42:** © CNRI/SPL/ Science Source. **1.44:** © Dr. Brad Mogen/Visuals Unlimited, Inc. **1.45B:** © Linda Stannard/ Science Source. **1.46:** © E. C. S. Chen/Visuals Unlimited, Inc. **Page 39, Gey:** Courtesy of The Alan Mason Chesney Medical Archives of The Johns Hopkins Medical Institutions.

Bölüm 2

Page 58, Anfinsen: Cour tesy of the National Library of Medicine. **Page 73, Singer:** Courtesy of S. J. Singer. **Page 73, Nicolson:** Courtesy of The Institute of Molecular Medicine, Huntington Beach, CA.

Bölüm 3

Page 93, Mitchell: © UPI/Corbis-Bettmann.

Bölüm 4

4.28: © Dr. Torsten Wittmann/Science Source. **Page 125, Temin:** Courtesy of the National Cancer Institute . **Page 151, Fire:** © Linda A. Cicero/Stanford News Service. **Page 151, Mello:** Courtesy of the University of Massachusetts.

Bölüm 5

Page 161, Venter: William Geiger Photography. **Page 161, Lander:** © Rick Friedman/Corbis. **Page 180:** Courtesy of Dr. Mae Melvin/CDC.

Bölüm 6

6.20: © Andrew Syred/Science Source. **6.22:** © James Cavallini/Science Source. **Page 190, Sharp:** © Donna Coveney, MIT.

Bölüm 7

7.30: From S. C. West, 2003. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 4: 1. Courtesy of A. Stasiak and S. West. **Page 241:** © David M. Martin, M.D./SPL/Science Source. **Page 246, Tonegawa:** © Donna Coveney/MIT.

Bölüm 8

Page 303, Steitz: Courtesy of the Yale University Public Affairs Office.

Bölüm 9

9.26B: © Scientifica/ADEAR/Visuals Unlimited, Inc. **Page 342:** © Dr. Thomas Deerinck /Visuals Unlimited, Inc.

Bölüm 10

10.1A: © David M. Phillips/Science Source. **10.2:** © Don Fawcett/Science Source. 10.19: © Dr. Donald Fawcett/ Visuals Unlimited, Inc. **10.30:** Courtesy of Zheng'an Wu and Joseph Gall, Carnegie Institution.

Bölüm 11

11.1A: © Richard Rodewald, University of Virginia/Biologi cal Photo Service. **11.1B:** © Don Fawcett/Science Source. **11.32:** © Dr. Thomas Deerinck/Visuals Unlimited, Inc. **11.38:** © K. G. Murti/Visuals Unlimited, Inc.

Bölüm 12

12.1: © K. R. Porter/Science Source. **12.11:** © E. H. Newcombe/ Biological Photo Service. **12.16A:** © Biophoto Associates/Science Source. **12.16B:** © Dr. Jeremy Burgess/ Science Source. **12.19:** © John N. A. Lett/Biological Photo Service. **12.20:** © Don Fawcett/Science Source.

Bölüm 13

13.11: © Susumu Nishinaga/Science Source. **13.14:** © Science Source. **13.19A:** © K. Wassermann/Visuals Unlimited, Inc. 13.19B: © Stanley Flegler/Visuals Unlimited, Inc. **13.19C:** © Don Fawcett/Science Source. **13.23A:** © Frank A. Pepe/ Biological Photo Service. **13.40A:** © Cytographics. **13.40B:** © Don Fawcett/Science Source. **13.45A:** © SPL/Science Source. **13.45B:** © Charles Daghlian/Science Source. **13.46A:** © K. G. Murti/Visuals Unlimited, Inc. **13.47A:** © Conly L. Rieder/ Biological Photo Service. **13.47B:** © W: L. Dentler/Biological Photo Service. **13.49:** From C. L. Rieder and S. S. Bowser, 1985, *J. Histochem. Cytochem.* 33: 165/ Biological Photo Service. **13.54:** © Don W. Fawcett/Science Source. **13.55A:** © Don W. Fawcett/Science Source.

Bölüm 14

14.7: © Harold H. Edwards/Visuals Unlimited, Inc. **14.11:** © Don Fawcett/Visuals Unlimited, Inc. **14.35A:** © R. N. Band and H. S. Pankratz/Biological Photo Service.

Bölüm 15

15.7 Secondary:© Biophoto Associates/Science Source. **15.15B:** © Don Fawcett/Visuals Unlimited, Inc. **15.27A:** © Don Fawcett/Science Source. **15.29A:** © Don Fawcett and R. Wood/Science Source. **15.30:** © E. H. Newcomb, Univ. of Wisconsin/Biological Photo Service. **Page 613, Buck:** Courtesy of Roland Morgan/Fred Hutchinson Cancer Research Center. **Page 613, Axel:** Courtesy of Don Hamerman/Colum bia University Medical Center.

Bölüm 17

17.4B: © David M. Phillips/Visuals Unlimited, Inc. **17.22, 17.27:** © Conly L. Rieder/Biological Photo Service. **17.28B:** © Michael Abbey/Science Source. **17.30:** © Michael Abbey/ Science Source. **17.31B:** © David M. Phillips/Visuals Unlimited, Inc. **17.34:** © C. Hasenkampf/Biological Photo Service. **17.40:** © David M. Philips/Visuals Unlimited, Inc.

Bölüm 18

18.13: © CMEABG-UCBL/Science Source. **18.14:** © Dr. Don
W. Fawcett/Visuals Unlimited, Inc. **18.24B:** © Yorgos Nikas/ Science Source. **Page 694, Horvitz:** © Donna Coveney, MIT.

Bölüm 19

19.1: © Astrid and Hanns-Frieder Michler/SPL/Science Source. **Page 740, Bishop:** © Reuters/Corbis-Bettman. **Page 740, Varmus:** © Reuters/Corbis-Bettman.

Dizin

A
A bandları, 494, 495
ABC taşıyıcılar, 555, 556
Abelson lösemia virüsü (ALV), 739
abl onkogeni, 739
  aktivasyonu, 763
  ilişkili olduğu kanserler, 742
  translokasyonu, 744
Absisik asit, 610, 610
Acil-erken gen, 628, 629
Açık-okuma çerçeveleri, 158
A'dan I'ya düzeltme, 308
Adenilil imidodifosfat (AMP-PNP), 509
Adenilil siklaz
  aktivasyonu, 612, 612, 616
  fonksiyonu, 264-265
  hormonal uyarı, 612
  inhibisyonu, 265
  uyarılması, 612
Adenin
  deaminasyon, 232, 235
  DNA'da, 8
  komplementer baz eşleşmesi, 6, 55
  metilasyonu, 238
  nükleik asitlerde, 54
  yapısı, 54
Adenin nükleotid taşıyıcısı, 458
Adenomlar, 726, 727
Adenovirüsler
  DNA, restriksiyon haritaları, 128
  hekzon mRNA'sının DNA'ya hibridizasyonu, 190
  intronlardaki mRNA, 189
  kanserle bağlantıları, 734
  Rb bağlanması, 752
Adenozin difosfat (ADP), 85, 458, 458
Adenozin trifosfat (ATP), 7
  aktin yürümesi, 481
  fonksiyonları, 43
  glukoneogenezde, 102
  hidrolizi, 496
  kemiozmatik üretimi, 460
  metabolik enerji ve, 81-89, 107
  sentezi, 96, 97, 98-99, 107, 448
  serbest enerji ve, 81-84
  taşınması, 458, 458
Adherens bağlantılar, 489, 489, 589, 589
Adhezyon kavşakları, 595
Adhezyon kemerleri, 498
Adhezyon proteinleri, 582-583
  aileleri, 587-558
  hücre-hücre etkileşimleri ve, 595
ADP. Bkz. Adenozin difosfat
Aflatoksin yapısı, 727
Agrekanlar, 582
Ağır kombine immün yetmezlik (SCID), 250
Ağır zincir genleri, Ig, 249
Ağlar
  aktin ağı, 484, 485
  çapraz iletişim ve, 642-643, 646
  düzenleyici, 177
  elemanları, 177
  mitokondrial, 449
  sinyalleşme yolakları, 182
  trans-Golgi, 422, 427, 427, 428
  yolak etkileşimleri, 176-177
Ailesel adenomatöz polipoz, 241, 753, 759
Akciğer kanseri
  insidansı, 724-725
  tedavisi, 764
Akciğerli balık genomu
Akış sitometresi, 653
Akışkan mozaik model, 71, 72
  güncellenmiş model, 542
  plazma zarı, 534-540, 540
Aksiyon potansiyelleri, 548-550, 606
Aksonemal dineinler, 510, 511
Aksonemler, yapısı, 515, 515
Aksonlar
  destekleri, 507, 507
  dev mürekkep balığı, 20, 509, 510, 547
  mikrotübüllerde, 506-508
  nörofilaman proteinlerinde, 521
  tau proteinlerinde, 508
Akt onkogeni, 738
Akt protein kinaz
  aktivasyonu, 699-700
  fonksiyonu, 634
  hücre sağkalımı ve, 749
  yolaklar, 630-635, 645, 748, 758
Aktif bölgeler, enzim, 63
Aktif taşınma
  ABC taşıyıcıları ile, 556
  enerji sağlanması, 553
  fonksiyonu, 568
  glukoz, 558
  iyon gradienti , 558-560
  modeli, 76
  tanımı, 76
Aktin
  boyanması, 141
  demetleri, 484
  organizasyonu, 496
  polimerizasyonu, 491
  tanımlanması, 480
Aktin ağları, 484, 485
Aktin filamanları
  adherens bağlantı ilişkisi, 489
  ayrışma, 479-484
  büyümesi, 480, 482
  çağraz bağlantıları, 484
  kararlılığı, 483
  metal gölgeleme, 31
  mikrografi, 480
  negatif boyama, 31
  organizasyonu, 479-493, 526-527
  plazma zarı, 526-527
  yapılanması, 479-484, 481
  yapısı, 479-493, 481, 526-527
  yürümesi, 481, 481
Aktin-bağlayan bölge (ABD'ler), 485, 487
Aktin-bağlayan proteinler
  hücresel rolleri, 480
  tanımı, 479
Aktine bağlanan proteinler, 485
α-Aktinin, 485, 486, 488, 488, 494
Aktinomisin D, 125, 125
Aktivasyon bölgeleri, transkripsiyon bölgeleri, 282
Aktivasyon enerjileri, enzim, 62, 63, 63
Aktivasyon ile uyarılan deaminaz (AID), 252
Akuaporinler, 546

Akut promiyelositik lösemi, 742, 760, 761
Alabalık hücrelerindeki anafaz, 678
Alanin, 56, 57
Alb3, 464
Albinizm, kısmi, 434
Albüterol, 493
Aldosteron, 603
Alg, 10, 12, 14, 14, 571, 573
Alk tirozin kinaz, 764
Alkilleme, 233
Alkilleyici ajanlar, 234
Alleller, tanımı, 112
Allen, Robert, 509, 510
Allosterik düzenlenme
  enzimlerin, 68, 69
  tanımı, 350
  ve protein regülasyonu, 361
Altbirimlere ayırma, 34-35, 44
Alternatif kesip-çıkartma
  Drosophila'da, 306
  Dscam geninde, 307, 307
  düzenlenmesi, 307
  ekzon birleşmesi ve, 312
  genel bakış, 306, 306-307
  ile modifiye edilen proteinler, 167-168
  tropomiyozin genleri, 483
  ve gen ekspresyonu, 194, 194, 367
Altın Küre Örümceği (*Golden Orb Spider*), 56
Altma, Sidney, 5, 297
Alzheimer hastalığı
  amiloid plaklar, 342
  amiloidlerde, 341
  tau proteinlerinde, 507
  temelleri, 342
  ve amiloid-β proteini, 641
Amanitin, 482
Amfipatik moleküller, 6, 52
Amiloid öncül protein, 341, 641
Amiloid proteins, 341, 341, 360
Amiloid-β protein, 341, 342, 641
Amilopektin, 50
Amiloplastlar, 465, 465
Amino asitler
  biyosentezi, 103
  diyetteki ihtiyaçlar, 104
  kolaylaştırılmış difüzyonu, 544
  polimerizasyonu, 104
  yapısı, 56, 57
Aminoaçil AMP, 104, 319
Aminoaçil tRNA, 105, 319, 330, 330, 331
Aminoaçil tRNA sentazlar, 122, 123, 318, 324
Amipler, 560
Amonyak (NH_3), 4
AMP ile aktifleştirilen kinaz (AMPK), 634
Ana dogma, 121
Anafaz
  alabalık hücreleri, 678
  ilerleme, 677-678
  kromozom hareketinde, 518
  metafazdan geçiş, 673
  mitoz, 670, 671, 672
Anafaz A, 518
Anafaz B, 518
  iğ kutbunun ayrılmasında, 519
  tanımı, 519-510
Anafaz I, 682, 682, 683
Anafaz II, 682, 685
Anafaza ilerleten kompleks / cycla-some (APC/C), 663, 684 bkz. APC/C übikütin ligaz
Anahtar-kilit modeli, 64
Anfinsen, Christian, 58, 59, 338, 344
Anjiyogenez, 730, 760
Ankirin, 487, 537
Anlamsız-aracılı mRNA yıkımı, 309-310, 312
Anogenital kanserler, 733
Antijenler, 140-142, 171, 245, 247, 248, 303
Antikodon, 318, 319, 320, 330, 451
Antikor genleri, 254-252, 255
Antikorlar
  monoklonal, 140, 760
  oluşumları, 140
  problar, 140, 154
Antimetabolit terapi, 105
Antiport, 559-560, 560
Antisens nükleik asitler, 149-150
AP bölgeleri, 232, 235, 235
AP endonükleazlar, 235
AP-1 transkripsiyon faktörü, 746, 746
Apaf-1, 696
APC geni, 753, 753
APC/C übikütin ligaz, 668, 677, 677
Apikal bölgeler, 428, 541
Apo -B100, 308
Apo-B48, 308
Apolipoprotein B, 308
Apolipoprotein B mRNA, 308
Apoptoz. Bkz. Programlı hücre ölümü
  bozuklukları, 732, 748
  düzenlenmesi, 696, 698-702, 719
  Fas-ile uyarılan, 701
  kaspazlar, 695-696
  mitokondriyel yolaklar, 697
  olayları, 692-695, 693, 719
  sinyal yolakları, 719
  uyarılması, 699
Apoptozomlar, 697, 698
Ara filamanlar, 520-526
  bağlanması, 523
  fonksiyonu, 524-526, 528
  hücre içi organizasyon, 528
  integrin bağlanması, 586
  proteinleri, 520, 520-521, 528
  tanımı, 520
  tipleri, 524
  yapılanması, 521-522, 528
  yapısı, 521-522
Arabidopsis thaliana
  boyutu, 187
  gen ekspresyonunda, 152
  genom duplikasyonunda, 202
  genomu, 159-160, 181, 204
  intronları, 192, 192
  kullanan çalışmalar, 20
  MAP mutantları, 577
  model organizma, 43
  sentromerler, 212
Aracılar, fonksiyonu, 268
Aralık bağlantılar (*Gap junctions*), 591-594, 592
  hücre-hücre etkileşimleri, 596
  ilintili hastalıklar, 593-594
  kanal proteinlerinde, 546
Araşidonik asit, 609
Ardışık kütle spektrometresi, 169-170, 170
ARF protein ailesi, 611
Arjinin
  nitrik oksit sentezi ve, 605
  translokasyonu, 463, 463
  yapısı, 57, 605
  yükü, 56
Arkebakteri
  DNA dizileri, 12
  evrimi, 8
Armadillo protein ailesi, 589, 590
Arp2/3 kompleksi, 482-483, 492
Artemisia annua (peygamber süpürgesi), 180
Artemisinin
  kullanımı, 179
  sıtma, 180
  yapısı, 179
Asbestoz, kanser ve, 728
Asetil CaA
  asetil grup transferi, 88
  fonksiyonu, 89
  glioksilat döngüsü, 468, 469

lipid sentezi, 102-103
oksidasyonu, 448, 449
oluşumu, 87, 89
Asetilkolin
bağlanması, 550
depolanması, 436
fonksiyonu, 431, 606, 615
salınımı, 549
yapısı, 606
Asetilkolin reseptörleri, nikotinik, 550, 615
Asidik aktivasyon bölgeleri, 283
Asidik amino asitler, 57, 57
Asiklovir, geliştirilmesi, 105
Asinar hücreler, 398, 398-399, 428
Asit hidlolazlar, lizozomal, 438
Asparajin, 56, 57, 346, 346
Aspartik asit, 5, 57, 557, 695
Aspirin, 609
Astrobiology, 8
Aşılar
anti-insan papillomavirüsleri, 734
anti-sıtma, 180
Ataxia telangiectasia, 669
Ateşböceği lusiferazı, 271
ATF4 transkripsiyon faktörü, 416
ATF6 transkripsiyon faktörü, 416, 417
ATM geni, 756
ATM protein kinaz, 669
ATP hidrolizi, 568
aktif taşıma ve, 547, 553-556
hücre hareketi ve, 508
kas kasılması ve, 496, 497, 500
protein translokasyonu ve, 454, 462, 463
proton taşınması ve, 438, 438
ATP sentaz, 95, 95
ATR protein kinaz, 669
AUC kodonları, 328, 329
AUG kodonları, 326
Aurora kinazlar, 674-676, 678-679
Aux/IAA ko-represör, 611
Avery, Oswald, 116
Avian lökozis virüsü (ALV), 737, 738
Axel, Richard, 613, 613
Aydınlık-alan mikroskopisi, 25
Azot (N_2)
fiksasyon süreci, 103
ilkel Dünya atmosferi, 4
Organik bileşiklerde özümsenmesi, 103
AZT geliştirilmesi, 105
Aβ protein, 342, 342

B

B lenfositler
AID ekspresyonu, 252
antijen reseptörleri, 624
antikor üretiminde, 140, 247-248, 743
EBV ile transformasyonu, 736
ilişkili olduğu kanserler, 402, 696
immünglobulin genleri, 248, 274, 274
immünglobulin yeniden düzenlenmesi, 248, 248
B tübülleri, 516
Bad proteini, 631, 698, 700, 700, 748, 749
Bağımsız replike olabilen diziler (ARS), 228, 228-229, 229
Bağırsak epitel hücreleri
glükoz taşınması, 559
yenilenmesi, 708
Bağırsak kök hücre çevresi, 711
Bağırsak kriptleri, 708
Bağlama faktörleri, 435
Bağlantı kompleksleri, 591, 591
Bağlantısal adhezyon molekülleri (JAM), 591
Bak proteini, 696, 697, 697-699
Bakteri
dinamikleri, 490
DNA dizileri, 12
DNA onarımı, 234
DNA polimerazı, 217, 219
evrimi, 8
genomları, 157-159
hücre duvarları, 571-573, 572, 595
IF faktörleri, 327
klonlanmış genlerin ekspresyonu, 134
kolonileri, 18
mRNA'ları, 295-296
örnek genomlar, 159
replikasyon orjinleri, 227
RNA polimeraz, 262
transkripsiyonu, 259-265, 310
Bakteri transformasyonu, 115, 116
Bakteri yapay kromozomları (BAC'lar)
ile insan genomu dizileme, 161, 161-162
kökenleri, 132, 132
Bakteriyofajlar. Bkz. Faj mutasyonları
bakteri yapay kromozomları, 132
maya yapay kromozomları, 132, 132
P1, 132, 132
plaklar, 42, 44
T4, 41, 121-122
λ, 130-131, 139
Baltimore, David, 39, 124, 125, 151
BamH1, 126, 128, 246
Band 3 proteini, 487, 487, 537-538, 538, 542
Band 4.1 proteini, 537
Barnacles, 56
Basit-dizi tekrarları, 197
Basset tazısı, 202, 203
Başlatma faktörü, ökaryot (eIF'ler), 326-337, 327
eIF2 fosforilasyon, 336
eIF2 salınım, 335
eIF2/GTP kompleks, yenilenmesi, 336
eIF4A'nın miRNA'lar tarafından interferansı, 334
eIF4E bağlanma proteini-1 (4E-BP1), 634
eIF4E düzenleme, 337
modülasyonu, 335
Başlatma faktörü, prokaryot (IF'ler), 326-329, 327, 327-337
eIF2 fosforilasyonu, 336
eIF2/GTP kompleks, yenilenme, 336
eIF4E bağlanma proteini-1 (4E-BP1), 634
eiF2 salınımı, 335
fonksiyonu, 290
Bax proteini, 696, 697, 697-698, 699
Bazal cisimler, 506, 515-516, 516
Bazal lamina, 577-578, 580, 582-583, 730
Baz-çıkarma tamiri, 235, 235, 252, 293
Bazolateral bölgeler, 428, 541
bcl-2 onkogeni, 742
bcl-2 genleri, 696, 749
Bcl-2 homoloji (BH) bölgeleri, 696
Bcl-2 protein ailesi, 696
apoptozun düzenlenmesi ve, 696, 719
düzenleyen etkileşimler, 697
hücre sağkalımı ve, 749
keşfi, 749
Bcr füzyon, 745
Beadle, George, 115
Becker kas distrofisi, 488
Benek (speckle), nukleer, 392, 393
Benign (selim) tümörler, 723-724
Benzo(α)pyren, 727

β-Arrestinler, 642, 643
β-Endorfinler, aktiviteleri, 607
β Fıçıları, 74, 74, 456
β-Galaktosidaz, 263
β-Globin, 191
β Tabakaları, 60
Beyaz kan hücreleri (akyuvar)
  doku invazyonu, 490
  hareketi, 492
  tipleri, 17, 560-561
  vimentin, 520, 521
  yönlendirilmesi, 587
B-hücreli lenfoma, 694, 696, 736, 742
1,3-Bifosfogliserat, 86, 100, 101, 115
Bikarbonat (HCO_3^-) iyonları, 48
Bim kodlanması, 701
BiP
  fonksiyonları, 412, 412, 421
  polipoptid zincirine bağlanması, 405, 405
Birincil hücre duvarları, 575, 575
Bishop, J. Michael, 739, 740, 740
Bitki hormonları, 644
Bitki hücreleri
  genişlemesi, 575-576, 576
  Golgi cisimciği, 421
  hormonlar, 610, 610-611
  hücre duvarları, 574
  klonlanan DNA'nın içine aktarılması, 144
  kültürde büyüme, 44
  kültürü, 39-40, 40
  mokrografı, 15
  seluloz, 427
  sitokinez, 678, 679
  vakuol, 429
  yapısı, 10
Biyoenerjetik, 81-109
Biyoinformatik, 173-175
Biyosentez
  amino asitlerin, 103
  karbohidratların, 101-102, 107
  lipidlerin, 108
  nükleik asitlerin, 106, 108
  pirimidin bazlarının, 106
  pirimidin ribonükleotidlerinin, 106
  polinükleotidlerin, 106
  proteinlerin, 108
  pürin bazlarının, 106
  yağ asitlerinin, 103
Blackburn, Elizabeth, 230
Blobel, Günter, 374, 401, 402, 402
Bonobo, genomu, 163
Boveri, Theodor, 505
Bölge-özgü rekombinasyon, 255
Bölünen maya. Bkz. *Saccharomyces pombe*
  hücre döngüsü, 655
Brady, Scott, 509, 510
B-Raf inhibitorü, 764
B-raf onkogeni, 742, 758, 761
B-Raf proteinleri, 764
Brasinosteroidler, 603, 611
BRCA1 mutasyonları, 759
BRCA1 tümör baskılayıcı genler, 753, 753
BRCA2 mutasyonları, 759
BRCA2 tümör baskılayıcı genler, 753, 753
Brenner, Sidney, 121
Broker, Tom, 190
Bromodeoksiüridin (BrdU), 385
Brown, Michael, 563, 564, 564
Buck, Clayton, 584
Buck, Linda, 613, 613
Burkitt lemfoması, 733
Burkitt, Denis, 736
Butel, Janet, 374
Büyüme faktörleri
  hücre döngüsü düzenlenlenmesi, 655
  peptid hormon ve, 644
  sentezi, 602
  yoksunluğu, 699
Büyüme hormonları
  aktivitesi, 607
  örneği, 607-608

C

Caenorhabditis elegans
  anatomisi, 19
  gen ekspresyonu, 152
  genomu, 19, 159, 159-160, 181, 204
  intronları, 192, 192
  kullanılan çalışmalar, 19
  MAP kinaz, 626
  model organizma, 43
  mutagenezi, 692
  programlanmış hücre ölümünde, 694, 695
  RNAi, 150, 151, 151
Cairns, John, 218
Cajal cisimleri, 391-392, 393
Cajal, Ramony, 391-392
CAK, 664, 664-665
Calvin döngüsü
  enzimleri, 98
  glukoz sentezi ve, 99-100
  yolakları, 100
CaM kinazlar, 636
cAMP fosfodiesteraz, 615
cAMP yanıt elemanları (CRE), 617
cAMP. Bkz. Siklik AMP (cAMP)
cAMP-bağımlı protein kinaz, 356, 356, 615
CAS, 377
CCND1 onkogeni, 742, 747
cdc2 mutantları, 659
Cdc25 fosfatazlar, 669
cdc28 mutantları, 659
Cdk inhibitörleri, (CKis), 665, 665
Cdk1, 357
  aktivasyonu, 669
  ile hücre döngüsü regülasyonu, 660
  defosforilasyonu, 662
  ile fosforilasyon, 676
Cdk2, 669-670
  aktivasyonu, 669
Cdk2/cyclin E, 668
  ile hücre döngüsü regülasyonu, 660
Cdk4, 747
  defosforilasyonu, 662
  cdk4 oncogene, 742
Cdk4,6/siklin D kompleksleri, 667
  ile fosforilasyon, 676
Cdk'lar. Bkz. Siklin Bağımlı kinazlar, 659-669, 664.
cDNA klonlama, 130
cDNA klonları
  hibridizasyonu, 167
  işaretlenmesi, 167
  prob olarak, 139
Cech, Tom, 5, 302
ced-3 genleri, 692, 694, 696
ced-4 genleri, 692
ced-9 genleri, 692, 694
Celera Genomiks, 161
CENP-A, epigenetik kalıtımı, 212, 212
cGMP fosfodiesterazlar, 619
Charcot-Marie-Tooth hastalığı tip, 287, 371, 593
Chargaff, Erwin, 118
Chlamydomas türleri, 14
Chow, Louise, 190
Ci transkripsiyon faktörü, 639
Cinsiyet steroidleri. Bkz. Estrogens; Progesterone, 603, 603-605
Cis-düzenleyici diziler, 271, 271, 273
Cis-etkili kontrol elemanı, 264, 310
CLASP proteinleri, 504, 504, 577
Claude, Albert, 30, 34
Clustered regularly interspaced palind-

romic repeats. Bkz. CRISPR
c-myc onkogeni
aktivasyonu, 747, 748
insan kanserlerinde, 743, 745
kanser ile ilişkisi, 742
kromozom yerleşimi, 744
let-7 hedeflenmesi, 756, 756
translokasyonu, 743
c-Myc transcripsiyon faktörü, 284, 717, 718, 742
Cockayne sendromu, 237-238
Cohen, Stanley, 608
Coiled coils, 370
Collins, Frances, 161
Collins, James, 178
Cooper, Geoffrey, 741
COPI fonksiyonu, 432-433
COPII, fonksiyonu, 432-433
COPII-kaplı veziküller, 433, 433-434
COPI-kaplı veziküller, 433, 433-434
Corey, Robert, 60
CREB, 617, 636
Creutzfeldt-Jakob hastalığı, 343
CRISPR/Cas sistemi, 154
genom-boyu tarama, 175
ile gen hedeflemesi, 149
ile genom mühendisliği, 148
Crick, Francis, 116-117, 218
Crizotinib, 761
Crm1 eksportin, 380
CTCF, 274, 275
bağlanma bölgeleri, 290
fonksiyonu, 311
CTNNB1 onkogeni, 742
Cx32/β1 mutasyonları, 593
Çapraz iletişim (*crosstalk*), 177, 642-643, 646
Çekinik genler, tanımı, 112
Çekirdek yerleşim sinyalleri, 373-374, 375
Çekirdekçik
mikrografi, 207
rRNA işlenmesi, 296, 393
rRNA transkripsiyonu ve, 387-390
yapısı, 388
Çekirdekçik organizasyon bölgesi, 387
Çekirdekçik-ilişkili bölge (NAD'ler), 384
Çevresel sinyaller, salgı yolakları, 428
Çift-iplik kırıkları, DNA
DNA tamiri, 254
homolog olmayan uç birleşmesi için, 242
homolog rekombinasyon ile tamir, 242
tamiri, 241-243
Çinko parmak bölgeler, 280, 281, 311
Çok hücreli organizmalar, gelişimi, 43
Çöktürme, ultrasantrifüj ve, 34
Çöp DNA, 195
Çözünürlük, mikroskobik, 23-24
Çubuk hücreler, fotoreseptörler, 618-619

D

Dachshunds, 202, 203
Dalgarno, Lynn, 325
Damar endotel büyüme faktörü (VEGF), 704
Darwin, Charles, 610
DDK protein kinaz, 668
De Duve, Christian, 34, 437, 560
Deinococcus radiodurans, 235
Deli dana hastalığı, 343
DeLisi, Charles, 161
Demir düzenleyici proteinler (IRP'ler), 332-333
Demiryanıt eşemanları (IRE'ler), 333
Denatürasyon, 60, 60
Denetim noktası kinazları, 669
Denge potansiyeli, membran, 549
Denge santrifügasyonu, 37
Denizkestanesi
embriyonik hücreler, 177
siklin tanımlamasında, 661-662
Siklinlerde, 660
Deoksinükleotid trifosfatlar (dNTPs)
DNA replikasyonu, 217, 218
Polimerizasyon, 219
Deoksiribonükleik asit (DNA). Bkz. DNA
2'-Deoksiriboz, 54-55
Deri
fibroblastal, 703
hastalıkları, 524-526
hücre soyları, 709
keratinler ve, 524-526
kök hücreleri, 709
Dermal doku, bitki, 14
Dermatan sülfat, yapısı, 581
Deterjanlar, protein çözmede kullanımı, 536
Dev mürekkep balığı aksonu, 509, 510, 547
Dezmin, 520, 521, 522, 524
Dezmoglein, 590
Dezmokolin, 590
Dezmoplakin, 522, 523, 589, 590
Dezmozomlar
ara filamanlara tutunma, 523
fonksiyonu, 589
keratin filamanlarına tutunma, 522
yapısı, 590
Diaçilgliserol (DAG)
ikinci mesajcı fonksiyonu, 635
üretimi, 418, 418, 635, 635-636
Dicer enzimi, 150, 196
Dictyostelium discoideum, 14, 15, 204
Dideoksinükleotidler, 132, 133
Diferansiyel interferens-kontrast mikroskopisi, 25
Diferansiyel santirfügasyonu, 34
Difüzyon
kolaylaştırılmış, 544-546, 545, 553, 559
önlenmesi, 429
pasif, 372, 372, 544
serbest, 75, 499, 544
Dimetilnitrozamin, 727
Dinamik kararsızlık
MAP' ler, 504
mikrotübül, 503
tanımı, 502
Dineinler, 508, 508, 516
aksomemal, 510, 511
sillerde, 509, 511
sitoplazmik, 511
Diploid hücreler, 112
Diploten, 681, 681
Disintegrinler, 585
Distrofin, 488
Disülfid bağları, 344, 412
Diyakinez, 681, 681
DNA amplifikasyonu, 253
DNA dizileme, 132-134, 133, 153
DNA dizileri, sentromerik, 211
DNA glikozilazlar, 235
DNA hasarı
direkt geri dönüştürme, 254
fotoreaktivasyon ile tamir, 234
ile uyarılan apoptoz, 699
karsinogenezde, 233
radyasyon ile, 233
ultraviole ışığı ile, 233, 234
DNA hasarı denetim noktası, 656, 669-670
DNA kesip-çıkarma tamiri, 236
DNA ligazlar, 130, 219, 219-220
DNA metilasyonu, 292, 292-293
DNA mikrodizinler, 166, 166
DNA polimeraz, 217-218
DNA polimeraz I, 217, 220, 224
DNA polimeraz III, 221, 224
DNA polimeraz V, 240
DNA polimeraz α, 222

DNA polimeraz δ, 221, 222, 238
DNA polimeraz γ, 218
DNA polimeraz ε, 222
DNA polimerazlar
dideoksinükleotidlerde, 132
DNA hatalı eşleşme tamiri ve, 238, 239
DNA kesip-çıkarma tamiri ve, 235, 235, 236, 237
DNA replikasyonu ve, 130, 135, 213, 217-232, 240, 254
doğruluğu, 240
E. coli, 118-119, 222
için primerler, 220
ile hata düzeltme, 225, 225-226, 241
ile katalizlenen reaksiyon, 218
PCNA bağlanması, 222
rolleri, 221
tanımlanması, 217-218
Taq, 135
DNA provirüs hipotezi, 125
DNA replikasyonu
başlatılması, 254, 668
DNA polimerazlarda, 217-232, 254
doğruluğu, 225-226, 254
işlenmesi, 217-232, 254
orijini, 226-230, 254
replikasyon çatalında, 218-225, 219, 254
S fazı ve, 668-669
telomerazlarda, 230-232, 254
telomerlerde, 230-232, 254
DNA tamiri, 232-243
çift-iplik kırıkları, 241-243, 254
fotoreaktivasyonda, 234
hasarın doğrudan uzaklaştırılması, 254
hatalı eşleşme tamiri, 238-240
kesip-çıkarma tamiri, 235, 254
kolon kanseri ve, 241
Okazaki fragmanları ve, 219-220
sınıfları, 232-233
transkripsiyon-bağlı tamir, 238
translasyon DNA sentezi, 254
DNA transpozonları, 198
DNA tümör virüsleri, 765
DNA yeniden düzenlenmeleri, 273-253
antikor genleri, 255
gen amplifikasyonu, 255
maya eşleşme tipleri, 255
DNA. Bkz. Rekombinant DNA; Satellite DNA; Telomerik DNA
bağlanan moleküller, 129
çöp, 195
genomik, 217-257
halka yapısı, 273, 273
hasarı, 232, 233, 233-235
hücresel içeriğinin belirlenmesi, 653, 653
klonlama, vektörler, 132
klonlanmış mutagenez, 144-146
mitokondriyel, 451
paketlenmesi, 206
PCR amplifikasyonu, 135-137
PCR ile amplifikasyonu, 136
plazmid DNA transferi, 143
recombinant, 126-135
replikasyon, 118-119, 153
restriksiyon haritaları, 128
rolü, 54
tanımlanması, 115-116, 153
tekrarlayan diziler, 214
telomerik, 213, 231
uydu, 198, 198
yapısı, 116-118, 117
yarı korumalı replikasyon, 118, 118, 119
λ, 127, 127, 128
DNA-afinite kromotografisi, 278, 278, 311
DNA-bağlanma bölgeleri, 281
DNA-bağlayan sarmal, 281
DNaz-aşırı duyarlı bölgeler, 289, 311
DNazların inhibisyonu, 695
Dobberstein, Bernhard, 402
Doğal analjezikler, 607
Dolikol, 413, 468
Dolikol fosfat, 347, 347, 360
Dolly, koyun, 715, 715
Dominant genler, 112
Dominant inhibitor mutantlar, 152
Dominant negatif mutantlar, 152
Dondurup-çatlatma elektron mikrograf, 537
Dondurup-çatlatma, metal gölgelemesi, 32, 32
Dopamin, 606
Döllenme
kromozomlar, 113
mayoz ve, 679-686
Döngüsel elektron akışı, 98, 99
Dönüştürücü (*Transformer: tra*) geni, 306
Dreifuss, Fritz E ., 371
Drosha nükleaz, 196, 196
Drosophila melanogaster
alternatif kesip-çıkartma, 306
az yoğunlaşmış kromozom bölgeleri, 286
de gen ekspresyonu, 152
de genetik çalışmalar, 113
de kaspaz regülasyonu, 697
de kromozom organizasyonu, 382
de ORC proteinleri, 229
genomu, 159, 159-160, 181, 204
hedgehog genleri, 638
intronlar, 192, 192
kullanılan çalışmalar, 20
MAP kinaz, 626
model organizma, 43
protein etkileşim haritası, 173
sentromerler, 211
Druker, Brian, 762
Dscam geni, alternatif kesip-çıkarma, 307, 307
DSIF, 284, 285
Duchenne kas distrofisi, 488
Dunnigan-tipi kısmi lipodistrofi, 371
Dur kodonları, 331-332
Düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) receptors, 564 -565, 565
Düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL'ler), 563, 563
Dynan, William, 279

E

4E-bağlayan protein(4E-BPs), 337
E2F transkripsiyon faktörleri, 667
E6 geni, 735
E7 geni, 735
Ecker, Robert, 657, 658
Eckhardt, Walter, 353
EcoRI fragmanları, 128
EcoRI kesimi, 127
Edidin, Michael, 73, 535
eEF1α/GTP rejenerasyonu, 331
eIF-2
fosforilasyonu, 336
salınması, 335
eIF-2/GTP kompleksinin rejenerasyonu, 336
eIF-4E, 633
eIF-4E bağlayan protein-1 (4E-BP1), 634
Eikozanoidler, 608-610, 609, 644
E-kadherin, 589
Ekdizon, üretilmesi, 603
Eksportinler, 377-379
Ekspresyon vektörleri, 134
Ekstraselüler matriks (ECMs)
adhezyon proteinleri, 587
hücre-matriks etkileşimleri, 577-

587, 595
örnekler, 578
polisakkaridler, 581-582
yapısal proteinler, 578-581
Ekzonlar
insan geni, 191
intronlar ve, 188-192, 214
tanımı, 189
Ekzonükleazlar, 220, 237
Elastik fiberler, 580-581
Elastin, 581
Elastoplastlar, 465
Elektriksel sinapslar, 592
Elektroforetik harekette değişim analizi
fonksiyonu, 311
tanımı, 275, 275-276
Elektrokimyasal gradient, 94
Elektron mikroskoplar, 30-32, 44
Elektron taşıma zinciri, 90-92
Elektron taşınması
fotosentez ve, 107
fotosistemler ve, 96-98
oksidatif fosforilasyon ve, 89-95, 91, 107
Elektron tomografi, 31
Elektroporasyon tanımı, 142
Elion, Gertrude B, 105, 105
Elk-1, 746
Ellis, Hilary, 694
Embriyolar, hücre döngüsü, 652
Embriyonik kök hücreler (ES)
den üretilen mutant fareler, 147
fare, 714
farklılaşması, 713, 714
klonlanmış DNA'nın aktarımı, 144, 145
kültürü, 37, 712-714, 713-714
memeli, 712
pluripotent, 712, 720
Emerin, 370, 372
Emery, Alan, 371
Emery-Dreifuss kas distrofisi, 371
ENCODE projesi, 176, 195, 195, 197
Endokrin sinyal iletimi, 602
Endometrium kanseri, 728
Endoplazmik retikulum (ER)
çıkış bölgeleri, 420
düz, 397, 418-421, 442
elektron mikroskopisi, 398
hedeflenen proteinler, 400-405
ile mikrotübül etkileşimi, 513
işlevi, 10, 397-421
kaba, 397, 400
kalite kontrolü, 414-417, 442
lipid çıkışı, 420-421, 442
lümeni, 406
protein çıkışı, 420-421, 442
protein eklenmesi, 405-411, 408, 441
protein girişi, 398
protein glikolizasyonunda, 413
protein hedeflenmesi, 403, 441
protein işlenmesinde, 411-414
protein katlanması, 411-414, 412
protein paketlenmesi, 421
protein sekresyonu ve, 441
proteinlerin posttranslasyonel translokasyonu, 405
sülfid bağlarının oluşumunda, 344
topolojisi, 407
yapısı, 397, 398
Endorfinler, fonksiyonları, 607
Endosimbiyoz, 11-12, 43, 450
Endositoz, 568
fonksiyonu, 560
klatrin-aracılı, 561-567
lizozom oluşumu ve, 439
Endotel hücreleri
adhezyon, 588
kan damarını döşeme, 704, 704
mikrograflar, 704
proliferasyonu, 704, 704
Endozomlar
protein hedeflenmesi, 427
tanımı, 438
tasnifte, 566
Enkefalinler
aktiviteleri, 607
fonksiyonları, 607
env genleri, 736
Enzim replasman terapisi, 437, 557
Enzimler
anahtar-ve-kilit modeli, 64
düzenlenmesi, 68-70
fonksiyonu, 62-70
genler ve, 115, 153
indüklenmiş uyarı, 64
kataliz, 63-66, 77
sıcaklıkta-kararlı, 135-136
substratları, 63
Enzim-substrat etkileşimleri, 64
Epidermal büyüme faktörü (EGF)
aktivitesi, 607
keşfi, 607-608
reseptörleri, 620
yapısı, 608
Epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörü, 764
Epidermolizis bullosa simpleks (EBS), 526
Epigenetik kalıtım, 312
CENP-A, 212
histone modifikasyonu ve, 291
histonlar ve, 290-291
tanımı, 212
Epigenetik, kromatin, 284-295
Epinefrin
fonksiyonu, 352
kas yanıtı, 69
yapısı, 606
Epitel hücreler
bağırsakta polarize, 541, 541
deri, 709
kültürü, 712
mikrograflar, 16
plazma zarı bölgeleri, 428, 429
tipleri, 15-16
Epstein-Barr virüsü (EBV), 733, 736
ER çıkış yeri (ERES), 420
ER-aracılıklı yıkım (ERAD), 414-417, 415, 442
ErbA, 748
erbB onkogeni, 742
erbB-2 onkogeni, 742
ErbB-2 proteini, 761
Erbitux, kanser terapisinde kullanımı, 761, 761
ER-Golgi ara kompartman (ERGIC), 420, 420, 433
Erikson, Ray, 353
Erişkin T-hücre lösemisi, 733, 733, 736
Erithrokeratoderma variabilis, 593
Eritropoietin, aktiviteleri, 607
Eritrositler
çekirdeği olmayan form, 369
dondurup çatlatma elektron mikrograf, 537
glikoforin, 537-538
işlevi, 17
kortikal hücre iskeleti, 487
mikrograflar, 16
morfoloji, 486
plazma zarı, 531
transmembran proteinleri, 542
zar proteinleri, 538
ERK kinazlar, 626
aktivasyonu, 628
PI 3–K ile çapraz ileti, 643
sinyal yolakları, 745
ERK MAP kinaz yolağı, 630
Erken endozom, tasnifte, 566
Erlotinib, 761, 763
Esansiyel amino asitler, 104
Escherichia coli

besinsel mutantları, 120
boyutları, 187
çalışmalar, 17-18
DNA polimeraz, 118, 221
DNA replikasyonu, 219
DNA tamiri, 234
gen regülasyonu, 263
genom, 158-159, 159
hatalı-eşleşme tamir, 238-239, 239
hücre duvarı, 8, 571
intronlar, 192
kolonileri, 18
lac operonu, 325
model organizma olarak, 43, 259
nükleotid-çıkarma tamiri, 238
peptidoglikanlar, 572
plazma zarı, 70
promotör yapısı, 260
replikasyon çatalı, 224
replikasyon orijini, 226
ribozomları, 319, 321
RNA bakteriyofajları, 124
RNA polimeraz, 260
tasarlanan devreler, 178
E-selektin ekspresyonu, 588
Etanol, 85, 86, 544
Etanolamin, 52, 53, 349
Etilen, 610, 610
Etyoplastlar, 466-467, 467
Evans, Martin, 713
Everolimus, 761

F

Fagolizozomlar, 441, 560
Fagositoz, 568
apopitoz ve, 693
fonksiyonu, 560, 560-561
hücre yüzey proteinleri ve, 491
lizozomlar ve, 440, 440-441, 443
örnekleri, 561
Fagozomlar, 440-441, 560
Fajlar, mutasyonları. Bkz. Bakteriofaj, 121-122
FAK (fokal adezyon kinaz), 624
Fareler
araştırma modeli, 22
genetik olarak değiştirilmiş, 22
genomu, 162, 163, 204
transgenik, 144-145, 144, 145
Fas, apoptoz uyarımı, 701
Faz-kontrast mikroskopi, 25
Fenilalanin
metabolizması, 115
yan zinciri, 56
yapısı, 57
Fenotipler, tanımı, 112
Ferritin, translasyonel regülasyonu, 332, 333
Ferrodoksin, taşıyıcıları, 98
Fetal globinler, 201
Fırça kenarlar, 490
Fibriler merkezi (FC), 388
Fibroblastlar
bağ dokusu ve, 17
deri, 703
farklılaşması, 718
kültürü, 37
mikrografiler, 16
proliferasyonu, 703-712
Fibronektin, 582, 582
Fibrosarkomlar, kökeni, 724
Filamanı (F) aktin, 480
Filamin
aktin ağı ve, 485
fonksiyonu, 485-486
Filopod, 484, 490
Fire, Andrew, 150, 151, 151
Fischer, Ed, 352
Flavin adenin dinükleotid (FADH2), 87, 91
Flavivirüsler, 38
Flipazlar, 419, 419
Floem, fonksiyonu, 15
Floresan ışımanın geri kazanımı (FRAP), 28, 27
Floresan ile aktive olan hücre ayırıcı, 653
Floresan işaret, 134
Floresan mikroskopisi, 26, 26-27, 27
Floresan problar, 33-34
Floresan rezonans enerji transferi (FRET), 28, 28
Fluoran *in situ* hibridizasyon (FISH), 140, 140, 383
Fokal adezyonlar, 488
oluşumu, 586, 586
Fokal kompleksler, 586
Folikül-stimüle eden horman (FSH), 607
Folkman, Judah, 760
Formin, 482, 482
dimerleri, 482
Fos proto-onkogeni, 746
Fosfat (HPO_4^{2-}) iyonları, hücresel, 47-48
Fosfatidiletanolamin
oluşumu, 418
plazma zarı, 70, 532
Fosfatidilinozitid (PI) 3-kinaz, Bkz. PI 3-Kinaz, 630-631
Fosfatidilinozitol
GPI çapası ve, 413
oluşumu, 418
plazma zarı, 70, 532
sentezi, 457
taşınması, 457
Fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat (PIP3), 631, 754
Fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat (PIP2), 630
Fosfatidilkolin
oluşumu, 418
plazma zarı, 70, 532, 532
sentezi, 457
taşınması, 457
Fosfatidilserin
iç mitokondrial zar, 693
oluşumu, 418
plazma zarı, 70, 532
programlanmış hücre ölümünde, 533
sentezi, 457
taşınması, 457
Fosfodiester bağları, 55
Fosfodiesteraz, 618
Fosfolipaz A2 (PLA2), 609
Fosfolipaz C (PLC)
aktivasyonu, 635
ile sinyalleşme, 644
kalsiyum iyonları ve, 635-637, 645
Fosfolipaz C-γ (PLC-γ), 635, 635
Fosfolipid çift-tabakalar, 6, 70
geçirgenliği, 74
Fosfolipid transfer proteinleri, 457, 457
Fosfolipid zar, kendi-kendine replike olan RNA, 6
Fosfolipidler
sentezi, 418
yapısı, 52
yer değiştirmesi, 419
zar, 6
zar yapısı, 52
zarlar içinde hareketlilik, 71
Fosforilaz kinazlar, 616
Fosfotirozin, 353
Foto-merkez, organizasyonu, 96
Fotoreaktivasyon, ile DNA tamiri, 234, 234
Fotosentetik reaksiyon merkezleri, 538, 538
Fotosentez
den enerji, 96-100
elektron transportu, 107
eşitliği, 95
gelişimi, 7-8

kloroplast ve, 458-467
Fotosistemler, elektron taşıma ve, 96-98
Fotosolunum, 469, 470
FOXO transkripsiyonu
düzenlenmesi, 632, 632
fonksiyonu, 748, 749
hücre sağkalımı ve, 700
PI 3-kinaz yolağı ve, 700
Franklin, Rosalind, 117
Frizzled reseptörleri, 640
Fruktoz, kolaylaştırılmış difüzyon, 544
Früktoz-1,6-bfosfat, 85
Frye, Larry, 73, 535
FtsZ, 573
Fuchs, Elaine, 524, 525, 525-526

G

G proteini- eşlikli reseptörler
çapraz iletişim çalışmaları, 642, 643
G proteinleri ve, 612-615
koku belirleme, 613-614
yapısı, 612
G proteinleri
G proteini-eşlikli reseptörler, 612-615
nörotransmitter reseptör eşleşmesi, 606
regülasyonu, 614, 614-615
siklik AMP sinyal iletimi, 611-619, 644
G_0 evresi, 655
ökaryotik hücreler, 653
G_1 evresi, 652, 653, 654, 655
G_1 siklinler
büyüme faktörleri ve, 665
düzenlenmesi, 665
G_2 evresi
denetim noktaları, 655
ökaryotik hücreler, 652
sırasındaki Cdk' lar, 668
G_2 siklinler, 663
Gag genleri, 736
Gametler, 113
γ-Aminobütirik asit (GABA), 606
γ-Tübülin halka kompleksi, 506
Gaucher hastalığı, 437
önlenmesi, 437
tedavisi, 437
temelleri, 437
tipleri, 437
Gcn5p, 286
GDP bağlanması, 743
Geçici durumlar, enzim, 63
Geçici ekspresyon, 142
Geçici farklılaşma, 718, 720
Geçiş şalterleri (Toggle switch), genetik, 178
Gefitinib, 761, 763
Gelinas, Richard, 190
Gelişigüzel kütle spektrometre, 169
Gen aileleri
globin, 201
tanımı, 201
Gen aktarımı
bitkilerde, 142-144, 154
hayvanlarda, 142-144, 154
Gen amplifikasyonu, 252-253, 255
Gen bağlantısı, 114
Gen dağılımı, 114
Gen ekspresyonu
antisens DNA veya RNA ile analizleri, 150
düzenlenmesi, 175-176, 182, 193, 193, 196
geniş çaplı analizleri, 166-167, 181
ile interferens, 148-152
Genel transkripsiyon faktörleri
ökaryotik, 310
tanımlanması, 266-269
Genetik geçiş şalteri (toggle switch), 178
Genetik kod, 121-124
evrensel, 451
mitokondriyel, 451
tanımlanması, 122, 153
yerleşimleri, 123
Genler
alternatif kesip-ekleme, 194
dominant, 112
duplikasyonu, 201-203, 214
düzenleyici elemanların korunması, 175
enzimler ve, 115, 153
fonksiyon için tarama, 174-175
homolog rekombinasyon ile inaktivasyonu, 147
iç-içe, 193
kalıtım ve, 111-119
klonlanmış, ekspresyonu, 153
knockout, 174
kromozomlar ve, 111-114
mutasyonların oluştuulması, 146-148, 154
ökaryotik, 187-194, 214
ökaryotik hücre, 189
protein ile doğrusal ilişkisi, 120, 120, 153
protein kodlamayan kodlayıcı diziler, 194-203
protein-kodlanması, 194
resesif, 112
tanım, 119-126, 134-135
tanımı, 112
transkripsiyonel düzenleyici elemanlar, 193
Genom dizileme, 164-165
Genom mühendisliği, 148
Genomik dalgalanma, 293, 293, 312
Genomlar
A. thaliana, 159-160
bakteriyel, 157-159
C. elegans, 159-160
D. melanogaster, 159-160
duplikasyonu, 202
E. coli, 158-159
göreceli boyutu, 188
H. influenzae, 157-158, 158
hücresel, 9
M. capricolum, 179
M. mycoides, 179
maya, 18, 157-159
S. cerevisiae, 158-159
sentetik, 179, 179
transkriptomlar ve, 157-167, 181
Genotipler, kanser, 112
Geribesleme inhibisyonu, 68, 350
Geribildirim döngüleri, 177, 641-642, 646
Gey, George, 39, 39
Gibberellik asit, 610
Gibbons, Ian, 510
Gibbs serbest enerjisi (G), 81-82
Gibbs, Josiah Willard, 81
Giberellinler, 610
Gilbert, Walter, 264
Gleevec, 763
Gli onkogeni, 754
Gli transtripsiyon faktörü, 639
Glial hücreler, 521
Glikoforin, kırmızı kan hücreleri, 537-538
Glikojen
metabolizması, 616
tanımı, 48
yıkımı, 352
Glikojen fosforilaz, 69, 354, 354
Glikokaliks, 540, 578
Glikolipidler, 360
çapa olarak, 349
hücre membranları ve, 52
lipid salları, 542
plazma zarı, 533
sentezi, 426, 426

yapısı, 52
Glikoliz
enerji üretimi, 7
Krebs döngüsü, 84-88, 107
mitokondriyel, 448
reaksiyonlar, 85, 86
tanımı, 7
Glikolizillenme, 346-347, 360
N-bağlantılı Glikolizasyon, 412
Glikoproteinler, 360
kalneksin ile katlanması, 415, 416
karbohidrat yan zincirleri, 346
N-bağlı Glikopreteinler, 347
Glikozaminoglikanlar (GAG'lar), 581, 581
Glikozidik bağlar, 48, 49
Glikozilfosfatidilinozitol (GPI) çapalar, 349, 349, 360
içeriği, 413
tanımlanması, 413
tutunan proteinler, 539, 540
yapılanması, 413
Glikozilseramide, 437
Glioksilat döngüsü, 468, 469
Glioksizomlar, 469
Gliserol fosfolipidler, 52
Glisin
mitokondriye taşınması, 469
yapısı, 57, 606
Globin gen ailesi, 201
Globüler (G) aktin, 480
Glucokortikoidler
etkisi, 604, 604-605
üretimi, 603
Glukagon, aktivitesi, 607
Glukoneogenez, 101, 101
Glukoseramid, 426
Glukoz
aktif taşıma, 558
bağırsak epitel hücreleri ile taşınması, 559
baskılanması, 264-265
kolaylaştırılmış difüzyon, 544-546, 545
oksidasyonu, 87, 448
sentezi, 99-100, 107
yıkımı, 354
Glukoz-1-fosfat, 69
Glukoz-6-fosfat, 85
GLUT4, 546
Glutamik asid, yapısı, 57, 606
Glutamin
yan zincirleri, 56
yapısı, 57
Goldstein, Joseph, 563, 564, 564
Golgi aygıtı, 421-429
ayrılması, 676
cis kompartmanı, 422, 422
den taşınma, 427
den vezikül taşınması, 420
hemiselüloz sentezi, 576
işlevi, 10
lipid metabolizmasında, 426-427, 442
organizasyonu, 422, 422-423, 442
orta kompartman, 422, 422
pektin sentezi, 576
polisakkarid metabolizmasında, 426-427, 442
protein çıkışı, 427-429
protein glikozillenmesi, 423-425, 442
protein tasnifi ve, 427-429, 442
topolojisi, 407
trans kompartman, 422, 422, 424
ye taşınma, 423
yerleşik proteinler, 427-428
yerleşimi, 513
Golgi kompleksi. Bkz. Golgi aygıtı
Gorter, Edwin, 531
GPI çapalar, 349
Gram, Hans Christian, 571
Grana, kloroplast, 459
Granüllü endoplazmik retikulum, 397, 400
Granülsüz endoplazmik retikulum, 397, 418-421, 442
Greider, Carol, 230
Grendel F., 531
Griscelli sendromu, 434
GRK protein kinaz, 642
Gross, Jerome, 587
GSK-3
baskılanması, 632
Ci/Gli fosforilasyonu, 639
rolleri, 701
GTP
hidrolizi, 502
mikrotübül polimerizasyonu ve, 502
GTP bağlanması, 433, 743
GTP/GDP değişimi, 336, 336
GTPaz-aktive eden proteinler (GAP'lar), 627
Guanilil siklazlar, 606, 618
Guanin nükleotid değiştirme faktörleri (GEF'ler), 626-627
Guanin, nükleik asit ve, 54
Guo, Su, 151
Gurdon, John, 715, 717
Güçlendirici RNA (eRNA), 295
Güçlendiriciler (Enhancers)
etkileri, 272, 272-274
fonksiyonları, 311

H
H kuşağı, 494, 495
H19 gen metilasyonu, 293
Haemophilus influenzae genomu, 157-158, 158
Hafif-zincir genleri, Ig, 248
Hanson, Jean, 494
Haploid hücreler, 113
Harris, Henry, 750
Hartwell, Lee, 657-658
Harvey sarkom virüsü, 742
Hata-düzeltme (Proofreading)
DNA polimeraz, 225-226
DNA replikasyonu, 225, 217, 225-226
replikasyonun doğruluğu ve, 254
Hayvan hücreleri
kültürde büyüme, 37, 37-39, 38, 44
mikrografileri, 72
mitoz aşamasında, 671
plazma zarları, 70
sitokinezde, 678
yapıları, 10
Hayvan virüslerinin yapısı, 40
Hedgehog, 645
Hedgehog genleri, 638
Hedgehog yolağı, 711
fonksiyonu, 638-641
inhibisyonu, 764
sinyalleşmesi, 639
Heksoz şekerler, 49
HeLa hücre izolasyonu, 38, 39
Helicobacter pylori, 728
Helikazlar, 379
aktivitesi, 223, 223
DNA eksizyon tamiri ve, 236
replikasyon orijini ve, 227
Hematopoetik kök hücre. Bkz. Kök hücre
den türeyen hücreler, 706-707
nakli, 711, 711
onkogenik dönüşüm, 731
Hemidezmozom, 522, 523, 586, 590
Hemiselülozlar
Golgi, sentezi, 576
kompozisyonu, 574
yapısı, 574
Hemoglobin
altbirimleri, 201
yapısı, 62, 62
Hepadnavirüsler, 38
Heparan sülfat, 581

Hepatit B virüsü, 733-734, 765
genom boyutu, 38
Hepatit C virüsü, 733-734, 765
Herceptin, 761
Herpes simpleks virüsü, 38, 271
Herpesvirüsler, 38, 733, 735-736, 765
Heterofilik etkileşimler, 588
Heterokromatin, 207
interfaz çekirdeğinde, 383
polikomb cisimcikler ve, 391
tanımı, 383
Heterokromatin protein 1 (HP1), 384
Heterotrimerik G proteinleri, 614
HIV proteaz, 346
HIV/AIDS
AZT için, 105
virüs RNA replikasyonu, 199
Hız santrifügasyonu
tanımı, 36, 36-37
Hidrofilik moleküller, 47
Hidrofilik zincirler, fosfolipid, 6
Hidrofobik moleküller, 47
Hidrojen (H^+) iyon taşınması, 555
Hidrojen (H_2), 4
3-Hidroksi-3-metilglutaril koenzim A redüktaz (HMG-CoA redüktaz), 564
Hidroksiprolin, 579, 579
Hiperkolesterolemi, ailesel, 563
Histamin, yapısı, 606
Histidin
yapısı, 57
yükü, 56-57
Histon asetilasyonu, 286, 287, 311
Histon deasetilaz, 287
Histonlar
DNA bağlanması, 203
epigenetik kalıtım ve, 290-292, 291
kromatin, 204-208
modifikasyon, 284-289, 288
özellikleri, 204
tipleri, 204
Hitchings, George H., 105, 105
HMG-CoA reduktaz, 563
Hoagland, Mahlon, 318
Hodgkin, Alan, 547
Holmes, Kenneth, 480
Homeodomain proteinler, 281, 311
Homofilik etkileşimler, 588
Homojenizasyon, 34
Homolog rekombinasyon
ile çift-iplik kırık tamiri, 242
kullanarak DNA tamiri, 242-243
tanımı, 147
Honjo, Tasuku, 252
Hooke, Robert, 23
Hormon reseptör bağlanması, 617
Hormonlar
bitki, 502, 610, 610-611, 644
büyüme hormonları, 607, 607-608
nörohormonlar, 607
peptid hormonlar, 607, 607, 644
sinyal iletimi, 602
tümör gelişimi ve, 728
Horvitz, H. Robert, 692, 694, 694
Horwitz, Alan, 584
HOTAIR lncRNA'lar, 294
Hozumi, Nobumichi, 246
Hsp70
ATP hidrolizi, 462
BiP fonksiyon, 412
fonksiyonu, 454-455
Hsp90
glukokortikoid bağlı, 604
Hunt, Tim, 661, 661
Hunter, Tony, 353, 353, 354
Hutchinson-Gilford progeria, 371, 371
Huxley, Andrew, 494, 547
Huxley, Hugh, 494
Hücre adhezyon molekülleri, 587, 587-589, 591
Hücre biyolojisi, araçları, 23-42, 44
Hücre büyümesi, hücre döngüsü düzenlenmesi, 653
Hücre döngüsü. Bkz. Anafaz; Mayoz; Profaz, 651-690
aşamaları, 652, 652-653
bölünen mayalarda, 655
düzenlenmesi, 653-656
embriyonik, 652
G_0, 710
ilerlemesi, 755
ilerlemesinin düzenleyicileri, 657-670
ökaryotlar, 651-657
tomurcuklanan mayalarda düzenlenmesi, 654
Hücre döngüsü denetim noktası, 656, 656-657
Hücre döngüsü duraklatılması
DNA hasarı denetim noktası, 669
p53 ve, 670
Hücre duvarları, 571-577
bakteriyel, 571-573, 572, 595
bitki, 574
E. coli, 8, 8-9
ökaryotlar, 573-577, 595
polisakkaritleri, 573
primer, 575
sekonder, 575
sentezi, 573
Hücre hareketi, hücre iskeleti ve, 479-530
Hücre içi sinyal iletimi, 611
Hücre iskeleti
hücre hareketi ve, 449-530
ökaryot hücreler, 11
Hücre korteksi, 486
Hücre kültürü
bitki hücreleri, 39-40, 40
hayvan hücrelerinin büyümesinde, 37, 37-39, 38, 44
hücre hatları, 38
hücre transformasyonunda, 732-733
ortam, 37-38
primer, 38
Hücre migrasyonu, 490-493, 491, 586, 729
Hücre ölüm reseptörleri, 701
Hücre ölümü, hücre yenilenmesi ve, Bkz. Apoptoz, programlanmış hücre ölümü, 691-722
Hücre plakaları, 679
Hücre proliferasyonu
büyüme faktörleri, 607-608, 651, 653, 655, 669
c-myc ve, 744
düzenlenmesi, 665
endotel hücreleri, 704
ERK sinyal iletimi ve, 642
GSK3 ve, 632
hormanal uyarı ve, 656
hücre ölümü ve, 691, 694, 703
hücre-hücre sinyal iletimi ve, 602
inhibisyonu, 632, 753, 754, 754-755, 755
insülin ve, 607
kanser ve, 241, 601-602, 726-737
konneksinler ve, 594
kök hücreler ve, 705, 707
miRNA' lar ve, 197, 277
onkogenez, 666, 738, 739-750, 756
PIP ve, 631
prostoglandinler ve, 610
Ras proteinleri ve, 351
Src fonksiyonları ve, 353
transkripsiyon faktörleri ve, 637
tümör baskılayıcı genler ve, 758
übikütin-proteazom yolakları ve, 357
Hücre sinyal iletimi, 601-649
Hücre yüzey çıkıntıları, 490-493, 491,

527
Hücre zarları. Bkz. Plazma membranı, *özgül* membranlar
lipidler, 77
proteinler, 77
taşıma, 74-76, 77
yapısı, 73, 73
Hücre-hücre adhezyonu, 582
Hücre-hücre etkileşimleri, 587-595
plazmodesmata, 594-595, 596
adherens kavşakları, 587-590, 595
aralık bağlantılar (gap junctions), 591-594, 596
sıkı bağlantılar, 590-591, 595
Hücre-hücre sinyal iletimi, tipleri, 602, 602, 644
Hücreler arası adhezyon molekülleri (ICAM'lar), 588
Hücreler. Bkz. Memeli hücreleri; Bitki hücreleri; Prokaryotik hücreler
deneysel model olarak, 17-22
evrimi, 4-17, 13, 43
inorganik iyonları, 47-48
korunmuş özellikleri, 18
kökeni, 4-17
kültürde transformasyon, 732-733
mikroskopik gözlemler, 25
molekülleri, 47-62, 77
özelleşmesi, 14
protein kompozisyonu, 170
Hücre-matriks adhezyonu, 582, 595
Hücre-matriks etkileşimleri, 577-587
Hücre-matriks kavşakları, 585
Hyaluronan akregan kompleksleri, 582
sentezi, 576
yapısı, 581
Hynes, Richard O., 584, 584-585

I

I bandları, 494
IAP'lar (apoptoz protein inhibitörleri), 697, 697
Idelalisib, 761
IF1, 326
IF2, 326
IF3, 326
Imatinib, 761, 762, 763
Infantil Refsum hastalığı (IRD), 472
INK4 tümör baskılayıcı gen, 753, 755
Inoué, Shinya, 510
IRE1 aktivasyonu, 416, 417
Isı-şok proteinleri (HSP'lar)
fonksiyonu, 340
Hsp40, 404-405
Hsp70, 340, 340, 404-405
Hsp90, 340
Işık reaksiyonları, 96, 97
Işık, kırılması, 23
Işık-algılama, 618-619, 618-619
Ivacaftor, 557, 557
IκB kinaz, 380
aktivasyonu, 638
IκB, sentezi, 642

İ

İç ribozom giriş yeri, 329, 329
İç-içe (nested) gen, 193
İğ kutubu cisimcikleri, 505
İğ kutupları, ayrışması, 519
İğ yapılanması denetim noktaları, 656, 677, 677
İki boyutlu jel elektroforezi, 168, 168
İkincil hücre duvarları, 575, 575
İkincil mesajcılar, 606
diacilgliserol olarak, 635
protein fosforilasyonu, 644
İkincil yanıt genleri, 629
İleri besleme düzenleyicileri, 177
İmmün sistemler, antikor genleri, 254-255
İmmün-baskılanma
AIDS ve, 65, 105, 346, 733, 736
B-hücre lenfoma ve, 736
kanser ve, 736-737
İmmünblotlama, 141
İmmünçöktürme, 171, 171, 303
İmmünfloresan, insan hücreleri, 141
İmmünglobülin (Ig) süperailesi, 587
İmmünglobülin A (IgA), 251
İmmünglobülin G (IgG), 251
immünglobülin gen yeniden düzenlenmeleri, 246-247
İmmünglobülin M (IgM), 251
İmmünglobülinler
ağır zincir genlerinin yeniden düzenlenmesi, 249
güçlendirici, 273, 274
hafif zincir genlerinin yeniden düzenlenmesi, 248
salgılanması, 402
T hücre reseptörelri ile reaksionu, 247
yapısı, 247
İmportinler, 375, 377-380, 378
İnce flamanlar, 496
İndol-3-asetik asit, 610
İndüklenmiş pluripotent kök hücreler, 717, 717-718
İndüklenmiş uyum, enzyme, 64
İnek, genomu, 204
İnfluenza virüs genomu, 38
İnositol 1,4,5-trifosfat (IP3), 635, 636
İnsan Genom Dizisi Konsorsiyumu, 160
İnsan Genom Projesi, 157, 160
İnsan genomu, 159, 159-160, 162, 204
analizi, 181
BAC klonları kullanarak dizileme, 161, 161-162
boyutu, 187
deneyleri, 161-162
fonksiyonel elemanlar, 195
tekrarlayan diziler, 197
İnsan immün yetmezlik virüsü. Bkz. HIV/AIDS
İnsan papilloma virüsleri
genomu, 38, 735
karşı aşı, 734
Rb bağlı, 752
İnsan T-hücre lenfotropik virüsü (HTLV), 733, 736
İnsanlar
genin özellikleri, 191
intronların genomu (Bkz. İnsan genomu), 192
İnsülin
aktivitesi, 607
amino asit dizisi, 59
proteolitik işlenmesi, 345
sentezi, 345-346
İntegral zar proteinleri, 71, 536
İntegrazlar, 199
İntegrinler, 488
aktivasyonu, 586
bağlanması, 624
hücre-hücre etkileşimleri ve, 588
özellikleri, 584-585
sinyalleşmesi, 624
yapısı, 583
İnterfaz
kromatin, 207
mitoz, 671, 672
nükleer heterokromatin, 383
tanımı, 652
İnterfaz hücreleri, 517
İnterfaz mükrotübülleri, 518
İnterlökin-2, 607
α-İnterneksin, 521
İntronlar
adenovirüs RNA, 189
ekzonlar ve, 188-192, 214
insan geni, 191-192
kendi-kendine kesip çıkartma, 304,

304-305
kesip çıkatma, 297
korunması, 191-192
örnek genomlar, 192
rollleri, 192-194, 214
tanımı, 189
İn-vitro mutagenez, 146
İn-vitro translasyon, 122
İpek, örümcek, 56
İribaş metamorfozu, 587
İskelet kasları
içeriği, 493
kök hücresinde, 710
işitsel tüy hücreleri, 490
İşlenmiş yalancı genler, 202, 202
İyon gradienti
aktif transport ve, 558-560
fonksiyonu, 568
İyon kanalları
fonksiyonu, 568
ligan kapılı, 547, 606
memran potansiyeli ve, 549
modeli, 546
voltaj kapılı, 547, 552
yapısı, 552
İyon pompaları, 553
İzolösin
hidrokarbon yan zinciri, 56
sentezi, 68
yapısı, 57

J

Jacob, François, 121, 263
JAK/STAT yolağı, 623, 714
Janus kinaz (JAK), 623, 623
Jel elektroforezi
embriyo DNA' sı, 246
iki-boyutlu, 168, 168
plazmasitoma DNA, 246
SDS-poliakrilamid, 141
λ DNA, 127, 127-128
Jun proto-onkogen, 746

K

Kabsch, Wolfgang, 480
Kadherinler, 489, 587, 588
Kadonaga, James, 279
Kalıtım, genleri ve, 111-119
Kalıtımsal polipsiz kolorektal kanser (HNPCC), 240, 241
Kallus, bitki, 40, 44
Kalmodulin
aktivasyonu, 636
fonksiyonu, 636
mikrovilli ve, 490, 490
MLCK ve, 499, 499
Kalneksin
fonksiyonu, 415, 415-416
ile protein katlanması, 415
Kalp kası, 493
Kalretikulin fonsiyonu, 415
Kalsiyum (Ca^{2+}) pompaları, 555
Kalsiyum (Ca^{2+}) iyon kanalları
plazma zarında, 636-637
voltaj-kapılı, 550
yapısı, 552
Kalsiyum (Ca^{2+}) iyonları
aktif taşınması, 555
fosfolipaz C ve, 635-637, 645
hücre içi, 636-637, 637
hücresel, 47-48
kas kasılması ve, 497-498
sitozolde, 636
Kamçı, 514, 514-517, 515, 516, 528
Kan damarları. Bkz. Anjiogenez
içini döşeyen endoteller, 704, 704
oluşumu, 730-731
Kan hücreleri, oluşumu. Bkz. Eritrositler, 707
Kan pıhtılaşması, 703
Kanal proteinleri, 75, 75, 544-546
Kanser, 723-769
de DNA amplifikasyonu, 253
den ölüm, 725
DNA tamiri ve, 241
erken tanı, 759-760
gelişimi, 723-733, 765
genomik, 757-758, 766
hücre hareketi ve, 490
kalıtsal, 759
korunma, 759-760
kök hücre transplantasyonu, 711
nedenleri, 723-733, 765
nitelikleri, 41
onkogenez, 625, 741-745
proteaz salınması, 587
ras genleri, 351
sinyal iletimi, 625
tarihsel gelişim, 724
tedavi, 760-765
tedavide moleküler yaklaşımlar, 758-766
telomeraz aktivitesi, 213
telomerler, 230
tipleri, 723-725, 725
virüsler ve, 41
yaş/yaşlanma ve oranları, 726
Kanser genomiği, 757-758, 766
Kanser hücreleri
kültürde transformasyon, 765
özellikleri, 728-732, 765
proliferasyonu, 728-729
sinyal ileti sistemleri, 729-730
Kapillerleri döşeyen, 704, 704
Kaposi sarkomu, 733, 736
Kaposi sarkomu-ilişkili herpes virüsü, 733, 735-736
Karaciğer kanseri, 733-734
Karaciğer yanilenmesi, 705
Karanlık reaksiyonlar, 96
Kararlılık genleri, fonksiyonu, 756
Karbohidratlar
biyosentezi, 101-102, 107
hücresel, 48-50, 77
Karbon dioksit (CO_2), 4
Karbon monoksit (CO)
Dünya'nın ilkel atmosferi, 4
nitrik oksid ve, 605-606, 644
Kardiyolipin, 457, 457
Kargo seçilimi, taşıma vizikülleri, 431
Karotenoidler, 465, 465-466, 466
Karsinojenler
DNA hasarı, 233
kimyasal, 727
tanımı, 727
Karsinomlar, 724
Karyoferinler, 377, 377
Kas distrofisi, 488
Kas hücreleri
ara filaman proteinleri, 521
yapısı, 494
Kas lifleri, 493
Kas satellit (uydu) hücreleri, 710
KASH proteinler, 370
Kasılabilen halkalar, 498, 678-679
Kasılan demetler, 485
Kaslar, kasılması, 493-498
Kaspaz-3, 697
Kaspaz-7, 698
Kaspaz-8, 701, 701-702
Kaspaz-9, 697, 698, 699, 701-702
Kaspazlar
apoptoz ve, 694-696, 719
hedefleri, 695
Katabolit aktivatör protein (CAP), 265
Katabolit baskılanması, 264-265
Katalaz, 468
Kataliz, enzimlerde, 62-70, 77
Katarakt, konneksin proteinleri, 593
α-Katenin, 589
β-Katenin, 589
aktivitesi, 747
Wnt sinyali ve, 640, 640-641
Kateninler, 489
Katlanmamış protein yanıtı (UPR), 416, 417

Kaufman, Matthew, 713
Kaveola, 543, 543-544, 567
Kaveolin, 543
Kavin, 643
Kayan filamanlar
fonksiyonu, 493-494
kas kasılması ve, 495
Kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS), 65, 105, 346, 733, 736
Kazein kinaz-1, 639
Keasling, Jay, 179
Kemik iliği transplantasyonu, 711
Kemiosmotik eşlenme, 92-96, 107
Kemiosmotik teori, 93
Kemoterapi, 105
Kemphues, Kenneth, 151
kendi-kendine kesip-çıkartma, 302, 312
Kendrew, John, 60
Keratan sulfate, 425, 581
Keratinler
flemanlar, 522, 522-524
fonksiyonu, 524
metafaz, 672
mutant, 525-526
tipleri, 520-521
Keseli sıçan genomu, 162, 163
Kesikli iplik
sentezi, 224
tanımı, 219-220
Kesim haritası, 128, 128
Kesim noktaları, 655
Kesintisiz kemer yapısı, 489, 498
Kesip çıkarma (eksizyon) tamiri, 235-338
baz-çıkarma tamiri, 235
çift-iplik kırıkları, 241-243
DNA tamiri, 254
hatalı-eşleşme tamir, 238-240
nükleotid-çıkarma tamiri, 235-240
transkripsiyon-eşlenik tamir, 238
translezyon DNA sentezi, 240, 240-241
Kesip-çıkartma (splicing) mekanizması, 300-306
in vitro, 300
α-Ketoglutarat, 265
Kıl üretimi, 709
Kırmızı kan hücresi. Bkz. Eritrosit
Kısa dağınık elemanlar (SINE'ler), 198, 199, 200
Kısa interfere edici (interfering) RNA (siRNA'lar), 150, 334
Kızamık virüsü, 38
Kilobazlar, tanımı, 191
Kimotripsin, 66
Kinetokorlar, 209, 672
mikrotübül bağlantısı, 676
mikrotübüller, 518
proteinleri, 212
Kinezin II, 512
Kinezinler, 508
artı-uç, 519
fonksiyonu, 508
izolasyonu, 509-510
yapısı, 511
yer değiştirme, 510
Kirschner, Marc, 502, 518
Kistik fibrozis
korunma, 557
tanımlanması, 557
tedavi, 557
temelleri, 557
Kistik fibrozis transmembran iletim düzenleyici (CFTR), 341, 556
Kit tirozin kinaz, 762, 763
Kitin
Hücre duvarı, 573, 573
kompozisyonu, 49
sentezi, 576, 581
Klatrin kaplı vezüküller, 433, 433, 434, 440, 562, 562
Klatrin, fonksiyonları, 432-433
Klatrin-aracılıklı endositoz, 561-567, 568
Klatrin-bağımsız endositoz, 567, 568
Klatrin-kaplı çukurlar, 561, 567
Klaudin, kuyrukları, 591
Klonal seçilim, 726
Klonlama
somatik hücrelerde, 715-717
terapötik, 716, 716
üreme, 716-717
Klonlama vektörleri, 130, 130, 132
Klorid (Cl^-) iyonları
hücresel, 47-48
taşınma bozukluğu, 557
Klorofil, 96
Klorokin, 180, 438
Kloroplast DNA, 461
Kloroplast sinyal tanıma peptidi (cpSRP), 464
Kloroplastlar, 458-467
ATP sentezi, 97
DNA, 461, 461
elektron taşıma ve, 97
fonksiyonu, 10, 459-461, 475
fotosentez ve, 96-100
gelişimi, 466
genomu, 461, 475
membranlar, 96
mikrografiler, 465
protein içeri alınması, 461-465, 475
protein tasnifi, 461-465, 475
RNA polimerazda, 265
yapısı, 459, 459-461, 475
Koaktivatörler, 311
Kodlama dizileri
protein, 187
protein olmayan, 187-188
Kodlamayan bölgeler (UTR'ler), 191
3' Kodlamayan bölgeler (UTR'ler), 333
5' Kodlamayan bölgeler (UTR'ler), 325
Kodlamayan genler, 194-203, 200
Kodlamayan RNA'lar, 196-197, 214
Kodlamayan uzun RNA'lar (lncRNA'lar, 197, 293, 294, 294, 312
Kodon-antikodon baz eşleşmesi, 320
Kodonlar, tanımı, 123
Koenzim A (CoA-SH), 85-86
Koenzim Q (ubiquinone), 90, 92
Koenzimler, 66-68, 68, 77
Kofilin, 483, 483, 492
Kohezinler, 675
Koku belirleme, 613-614
Koku reseptör protein ailesi, 613
Kolaylaştırılmış difüzyon
glukoz, 545
küçük moleküllerin taşınması, 544-546
Kolera toksini, 567
Kolesteroller
hücre membranları ve, 52
lipid sallar, 542
plazma zarı, 533
sentezi, 419, 457
taşınması, 457, 563
yapısı, 52, 533
zar akışkanlığı ve, 71, 71
Kollajenler
fibronektin bağlanması, 582
tip IV, 580
tipleri, 579
yapısı, 578
Kollejen lifler, 580, 580
Kollenkim hücreler, 15, 15
Kolon polipleri, 241
Kolon/rektal karsinomlar
adenomlar, 726
gelişimi, 726
genetik değişiklikler, 757
insidansı, 724-725
karsinomlarda sağkalım oranları, 759

Kolonoskopi, 759
Kolsemid, 502
Kolşisin, 502
Kondensinler, 674
Kondroitin sülfat, 425, 581
Konfokal mikroskopi, 28, 28, 29
Konneksinler, 592
Knockout fare, 147
Kontakt inhibisyon, 728, 729
Konvasiyonel olmayan miyozin, 500, 527
Ko-represörler, 311
Kornberg, Arthur, 217
Kortikostereoidler, 603
Kortizol, yapısı, 603
Kozmid vektörler, 131-132, 132
Kök hücreler. Bkz. Hematopoetik kök hücreler
  çoğalma, 705, 705-711, 719
  deri, 709
  doku devamlılığı ve, 703-712, 719
  fonksiyonu, 705-711
  hücre çoğalması ve, 705, 707
  iskelet kası, 710
  pluripotent, 712-718, 717
  tıbbi yaklaşımlar, 711-712, 719
Köpekler
  genomları, 162, 163, 204
  koku reseptörleri, 612
Köygöçüren mantarı (*Amanita phalloides*), 482
Krebs döngüsü, glikoliz ve, 84-88, 107
Krebs, Ed, 352, 615
Krista, mitokondri, 448, 448
Kromatin
  bileşimi, 204-208
  epigenetik ve, 284-295
  güçlendiriciler, 288
  interfaz, 207
  kromozomlar ve, 203-204, 214
  metafaz, 672
  promotörler, 288
  transkripsiyonel olarak aktif, 385, 393
  transkripsiyonel olarak inaktif, 385
  yapısı, 214
  yerleşimi, 393
  yoğunlaşması, 208
Kromatin immünçöktürme, 276, 277, 311
Kromatin iplikleri, 206
Kromatin yapısal koruyucu (SMC), 674
Kromatin yeniden düzenlenme faktörleri, 289, 289, 311
Kromatozomlar, 206, 206
Kromoplastlar, 465
Kromozom konformasyon yakalama (3C), 274, 384
Kromozom mikrotübülleri, 518
Kromozomlar. Bkz. Sentromerler; Telomerler
  ayrımı, 508, 510, 517
  az yoğunlaşmış bölgeler, 286
  BAC' lar, 132
  etkileri, 384-385, 385
  DNA replikasyonu, 217
  döllenmede, 113, 685-686
  Drosophila, 19, 211, 382
  E. coli, 226, 226-227
  bölgeleri, 381-382, 393
  FISH, 140, 383
  gen translokasyonu, 744-762
  genler ve, 111-114, 146-148
  globin genleri, 201, 201
  hareketi, 11, 84, 210, 518-520, 528
  haritalaması, 161
  histon transferi, 280, 281
  hücre döngüsü ve, 652-653
  inaktivasyonu, 197, 625, 625
  kromatin ve, 203-204, 214
  M fazı, 670-679
  mayalar, 18, 228, 244
  mayozda, 113, 679-685
  memeli nükleusu, 382
  metafaz, 208, 209
  mitoz, 209, 501
  organizasyonu, 381, 381-386, 382
  ökaryot, 4, 204
  PAC'lar, 132
  politen, 381
  prokaryot, 4
  proteinler, 115
  replikasyon orjini, 227, 227-228, 228
  sentetik, 181
  tanımı, 112
  telomerler, 213, 213, 230-232, 231, 392
  viral DNA, 124, 124
  YAC' lar, 132
  yalıtıcılar, 274
  yoğunlaşması, 224, 661, 670
  yoğunlaşmış, 286, 517, 518, 670
Kronik miyeloid lösemi (KML), 762, 762, 763
Kurbağa genomu, 162
Kuru, 343
Küçük molekküller, taşınması, 544-560, 568
Küçük nükleer ribonükleoprotein partikülleri (snRNP), 301, 312
Küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar), 312
  immünçöktürmesi, 303
  kesip-ekleme bölgesine bağlanma, 302
  keşfi, 303-304
  kodlamayanı, 192
  taşınımı, 380
  tipleri, 301
Küçük nükleolar RNA'ları (sno RNA'lar), 389, 389
Kültür ortamı, 37-38
Kültürde hücre transformasyonu, 732-733
Kütle spektrometresi, 168-169, 169

L

lac operonu
  E. coli, 325
  kontrolü, 264, 264
  negatif kontrolü, 263
Lacks, Henrietta, 39
Lactobacillus casei, 105
Laktoz metabolizması, 263
Lamellipod, 490, 561
Lamin A protein, 371
Lamin B reseptör (LBR), 370, 372
Lamina, hastalıklarla ilintili, 371
Lamina-ilişkili bölgeler (LAD'ler), 384
Lamininler
  bazal lamina, 582
  kendi-kendine yapılanması, 582-583
  kompozisyonu, 583
Laminler
  kesilmesi, 695
  tanımı, 369
  yapılanması, 370
Lander, Eric, 161, 161
Lapiere, Charles, 587
Lasek, Ray, 510
Laskey, Ron, 338
Leber'in kalıtsal optik nöropatisi (LHON), 451, 452-453
  engellenmesi, 452
  tanımı, 452
  tedavisi, 452-453
  temelinde, 452, 452
Leibler, Stanislas, 178
Lenfoma, tanımı, 724
Lenfositler

fonksiyonu, 17
mikrografi, 16
Leptotene, 681, 681
Lerner, Michael, 303
let-7 miRNA, 756
Levi-Montalcini, Rita, 607
LINC kompleksi, 370
Ligand-kapılı kanallar, 547
Lignin, 575
Lipid çift tabakalar, 6_7
dondurup-kırma, 32
plazma zarı, 531-534, 532
Lipid sallar
bileşenleri, 542
kaveola, 543, 543-544
mikrografi, 543
oluşumu, 534
yapısı, 534
Lipidler
biyosentezi, 108
den enerji, 89, 107
ER'lerden dışarı çıkma, 420-421
hücresel, 77
metabolizması, 426-427
plazma zarı, 533
rolü, 50-54
salgı yolağı taşınması, 427
sentezi, 68-69
takılması, 348-350
Lipoksijenaz (LOX), 609
Lipopolisakkarid (LPS), 572
Lipozomlar, 142
Lizin
yapısı, 57
yükü, 56
Lizozomal depo hastalığı, 436-437
Lizozomal proteoliz, 358-359
Lizozomlar, 361, 436-441
asit hidrolazlar, 436-438, 443
endositoz ve, 438-440, 443
fagositoz ve, 440, 440-441, 443
fonksiyonu, 10, 358
oluşumu, 438-440, 439, 443
organizasyonu, 438
otofaji, 440, 440-441, 443
protein komposizyonu, 170
vakuol olarak fonksiyonu, 429, 429
LMNA geni, 371
L-myc onkogen, 742
Lökoplastlar, 465
Lökositler, adhezyonları, 588
Lökotrienler, 609
Lösemi baskılayıcı faktör (LIF), 714-715
Lösemi, farklılaşması, 731
Lösemiler
farklılaşması, 731
tanımı, 724
Lösin
hidrokarbon yan zinciri, 56
yapısı, 57
Lösin fermuarları (Lösin zippers), 311
DNA-bağlanma bölgesi, 281-282
kompozisyonu, 281
LRP reseptörleri, 640
Lumacaftor, 557

M

M çizgileri, 496
M evresi
Cdk'lar sırasında, 668
düzenlenmesi, 673
olayları, 670-679
ökaryotik hücreler, 652
MacLeod, Colin, 116
Magnezyon (Mg^{2+}) iyonları, hücresel, 47-48
Makrofajlar
fagositoz ve, 440
fonksiyonu, 17
taramalı elektron mikroskopi, 32
Makromoleküller, evrimi, 5
Makronükleus, poliploidi, 383
Makropinositoz, 561
Malin tümör
farklılaşması ve, 731
tanımı, 724
Maller, James, 660, 662
Mannoz-6-fosfat, 424, 425
Mannoz-6-fosfat reseptörleri, 438
MAP kinazlar, 626-630
ile sinyalleşme, 644
yolak, 645
MAP'lar. Bkz. Mikrotübül-ilişkili proteinler (MAP'lar)
Markert, Clement, 657, 658, 658
Martin, Gail R., 713, 713
Martin, Steven, 738
Masui, Yoshio, 657, 658, 658
Matriks işlemci peptidazı (MPP), 455
Matriksler, mitokondri, 448
Matthaei, Heinrich, 123
Maya ikili hibrit sistemi, 172, 172
Maya yapay kromozomlar (YAC), 132
Mayalar
çalışmaları, 18-19
DNA onarımı, 234
eşleşme, 601
eşleşme tipi değişikliği, 245
eşleşme tipleri, 244-245, 255
genleri, 13
genomu, 157-159
MAP kinaz, 626
model organizma, 43
replikasyon orijini içinde, 228, 229
RNA polimeraz II içinde, 266
salgı yolağı çalışmaları içinde, 435
sentromerleri, 210, 210
sitokinez, 678
vakuoller, 429, 429
Mayoz
döllenme ve, 679-686
kromozomlar, 113
tanımı, 112-113
McCarty, Maclyn, 116
McClintock, Barbara, 244
McCulloch, Ernest, 705
McKnight, Steven, 279
MCM helikaz proteinleri, 668
MEK (MAP kinaz/ERK kinaz), 627
inhibitörleri, 764
Mello, Craig, 150, 151, 151
Membrane potansiyeli, 549
Meme kanseri
BRCA mutsyonları, 759
genetik değişiklikler, 757
ile ilgili genler, 753
insidansı, 724-725
Memeli genomu, 159
Mendel, Gregor, 112
6-Merkaptopürin, 105, 105
Merkel hücre polyomavirüsü, 733, 734, 765
Merkel hücrekoarsinomu, 733
Mesajcı ribonükleoprotein partikülleri (mRNA'lar), 297
Mesajcı RNA (mRNA)
3' uçları, 299
adenovirüs DNA'sına hibridizasyon, 190
adenovirüs intron, 189
bakteriyel, 295-296
nükleus dışına taşınma, 379
organizasyonu, 324-326, 360
ökaryotik hücreler, 298, 324
prokaryotik, 324
protein sentezinde, 104-105
revers (ters) transkripsiyonu, 167
rolü, 54, 120-121, 153
translasyonun düzenlenmesi, 332
tanımı, 121
translasyonu, 317-337, 332
yıkım, 310
Meselson, Matthew, 118, 121

Metabolizma
biyoenerjetikler ve, 81-109
evrim, 7-8, 43
oksidatif, 8
Metafaz, 517
anafaza geçiş, 673
iğ iplikleri, 676
kromatin, 208, 208
kromozomlar, 208, 209
mitoz, 670, 671, 672
Metal gölgeleme, 31, 31-32
Metan gazı (CH_4), 4
Metastaz, tanımı, 724
7-Metilguanozin kepleri, 298, 312
Metionil tRNA, 330
Metionin
hidrofobik özellikleri, 56
protein sentezinde, 325
yapısı, 57
Mide kanseri, 728
Mikroçevreler, nişler, 710
Mikrofilamanlar, 479
MikroRNA (miRNA'lar)
dubleks oluşumu, 334
fonksiyonu, 334
ile düzenlenen translasyon, 335
ile gen düzenlenmesi, 335
kodlamayan, 192
mRNA translasyonu ve, 332
RNA interferens ve, 196
rolü, 293-295
transkripsiyon, 196
Mikroskoplar
aydınlık-alan, 24-25, 25
çözünürlüğü, 23-24
diferansiyel interferens-kontrast, 25
elektron, 30-32
faz-kontrast, 25
floresan, 26, 26-27, 27
kararlılığı, 506
konfokal, 28, 28, 29
multi-foton eksitasyon, 29
numerik açıklık, 24
STORM, 33, 33-34
Süper çözünürlüklü ışık, 32-34, 33
tarama elektron, 32, 32
transmisyon elektron, 30, 30
video ile güçlendirilmiş diferansiyel interferans- kontrast, 26
Mikrotübül ilişkili proteinler (MAP'lar), 503, 503-504, 507-508
Mikrotübül organize edici merkezler, 505
Mikrotübüller, 501-508
astral (yıldızsı), 518
hücre içi organizasyonu, 505, 512-514
interpolar, 518
kargo taşıması, 512-514, 528
kinotokor tutunması, 676
kinotokora bağlanma, 209
kromozomal, 518
metafaz, 672
mitoz sürecinde organizasyon, 517, 518
motor protein bağlanması, 509
motor proteinler, 508
organizasyonu, 506-508, 527
oryantasyonu, 527
polimerizasyonu, 502
selüloz sentezi ve, 577
sinir hücresi, 507
yapılanması, 505-506, 527
yapısı, 501, 501-505, 527
Mikrovilluslar, 489-490, 527
mikrografisi, 489
miyozinler ve, 500
organizasyonu, 490
Mikrozomlar
salgı protein katılımı, 401
türetilmesi, 401
Miller, Stanley, 4
Milstein, Cesar, 402
Min1 proteinler, 456
Mineralokortikoidler, üretimi, 603
MiR-17-92, 756
MiR-34, 756
Mitchell, Peter, 92, 93, 93
Mitchison, Tim, 502, 518
Mitojen ile aktive edilen protein kinazlar, Bkz. MAP kinazlar
Mitokondri, 447-458
ağları, 449
aksidatif metabolizması, 449
apoptosis yolağı, 697
dış zar, 449, 456
DNA, 451
elektron taşıma zinciri, 90-92
enerji üretimi, 457-458
fonksiyonu, 10, 448-450, 475
genetik sistemi, 450-453, 475
hastalıkları, 452-453
iç zar, 455, 458, 475
içine protein girişi, 453-456, 475
içine protein taşınması, 339
lipidler, 457, 475
organizasyonu, 448-450, 475
protein kompozisyonu, 170
RNA polimerazları, 265
şaperonlar, 339, 339
yapılanması, 453-456, 475
yapısı, 448
zarlar arası alan, 456
Mitokondrial genomlar, insan, 450, 450
Mitotik denetim noktası kompleksi (MCC), 677
Mitotik iğ, 517, 517, 672
Mitoz, 672
açık, 673
açıklama, 673-676
aşamaları, 670-673, 671
kapalı, 673
kromozomlar, 209
mikrotübül organizasyonu, 517-518
tarama elektron, 652
Mitzutani, Satoshi, 125
Miyelomlar, immünglobulin salgılanması, 402
Miyelomonositik lösemi, 763
Miyozin hafif zincir kinaz (MLCK), 499
Miyozin I, 490, 500, 500
Miyozin II, 496, 496, 499, 500
Miyozin V, 500
Miyozin VI, 500
Miyozinler
etkisi, 497
flaman organizasyonu, 496
fonksiyonu, 493
konvansiyonel olmayan, 500
MLH proteinler, 239, 239-240
MLKL, 702
Moleküler biyoloji, temelleri, 111-156
Moleküler taşıma, küçük moleküller, 544-560
Moleküller, hücresel, 47-62
Monod, Jacques, 263
Monoklonal antikorlar
kanser terapisi, 760
üretimi, 140
Monosakkaridler, hücresel, 48-50
Monosistronik mRNA'lar, 325
Monositler
fonksiyonu, 17
mikrografi, 16
Moore, Peter, 323
Motor proteinler, mikrotübül, 508
MreB, 573
MRNP, 312
MSH proteinler, 239, 239-240
mTOR yolağı, 630-635, 633, 645, 701

baskılanması, 764
ile düzenlenen otofaji, 634
mTORC1, baskılanması, 633, 634
Mullis, Kary, 135
Multi-foton eksitasyon (uyarı) mikroskopisi, 29, 29
Mut proteinleri, 239-240
Mutagenez
klonlanan DNA, 144-146
sentetik oligonükleotidler, 146
Mutasyonlar, tanımı, 113
Mükrotübül motorları, 508-520, 527-528
Myc proteinleri, 746
Mycoplasma capricolum genomu, 179
Mycoplasma mycoides, sentetik genomu, 179
MyoD, 718
myofibril, sitoplazmik, 493
Myoglobin, 60
Myozin motorlar, 493-500
kas kasılması ve, 493-498, 527
kasılabilir yapıları, 527
konvansiyonel olmayan miyozin, 527

N

NADP redüktaz, 98
NADPH, 98, 103
Negatif uzama faktörü (NELF), 284, 285
Nanhomolog uç birleşmesi, 242
Nanog transkripsiyon faktörü, 717
N-Asetilgalaktozamin, 346, 573
N-Asetilglukozamin (NAG)
glikozilasyon, 346, 346, 347, 424, 424, 425
kitinde, 573, 573
polisakkarit zincirlerde, 572, 581, 581
N-Asetilmuramik asit, 572
Naxo, fonksiyonu, 756
Nazofarenks karsinomaları, 733
N-bağlı Oligosakkaritler
modifikasyonu, 423-425, 424
Neandertal genom, 162, 164
Nekroptoz, 702, 702
Nekrotik hücre ölümü. Bkz. Nekroptozis
Nekroz, apoptoza karşı, 692
Neksin, 515
Nektin, 590
Nemst eşitliği, 548
Neonatal lökodistrofi (NALD), 472
Nestin, işlenmesi, 520-521
Neurospora crassa çalışmaları, 115
Nicolson, Garth, 73, 536
Nidojen, 582-583
Niedergerke, Ralph, 494
Nikel karbonil, 727
Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+), 67, 67, 85
Nikotinik asetilkolin reseptörleri, 550
Nirenberg, Marshall, 123
Niş, kök hücre, 710
Nişastalar, tanımı, 48
Nitrik oksit (NO)
karbon monoksid ve, 605-606, 644
sentezi, 605, 605
N-Miristillenme, 348, 348, 360
N-myc onkogen, 742
Noller, Harry, 323
Nomura, Masayasu, 322
Norepinefrin, 606
Northern blotlama, 138-139
Notch yolağı, 645, 711
ile sinyalleşme, 641, 641
Nöral hücre adhezyon molekülleri (N-CAMs), 588-589
Nörofilaman (NF) proteinleri, 521
Nörohormonlar, 607
Nöronlar. Bkz. Sinir hücreleri
apoptoz ile ölüm, 699
sinaptik iletim, 431
tanımı, 17
Nöropeptidler
aktiviteleri, 607
salgılanması, 607
Nörotransmitter reseptörleri, 611-612
Nörotransmitterler
ile sinyalleşme, 606-607
salınımı, 549, 550, 606
tanımı, 644
yapısı, 606
Nurse, Paul, 659, 660
Nükleer benekler, 392
Nükleer cisimler, 386-392, 387, 393
Nükleer çıkış sinyal, 377, 378
Nükleer lamina
tanımı, 369
yapısı, 369
Nükleer por kompleksi, 393, 675
fonksiyonu, 367, 372-373
modeli, 373
mikrografı, 372
proteinin içeri doğru alınması, 376
trafik yönü, 372
Nükleer por, yapısı, 369
Nükleer reseptör süper ailesi
hormon reseptörleri, 604
steroid hormonlar, 603-605
Nükleer taşıma reseptörleri, 373
Nükleer zarf
çekirdek por kompleksi, 393
protein taşıma, 393
trafik, 392
yapısı, 367-372, 368
yıkımı, 675, 676
Nükleer zarlar
dış, 367-369, 368
iç, 367-369, 368
Nükleik asit baz eşleşmesi, 55
Nükleik asit hibridizasyonu
ile DNA belirlenmesi, 137
tanımı, 137
Nükleik asitler
anlamsız, 149-150
bileşenleri, 54
biyosentezi, 106, 108
hibridizasyonu, 154
hücresel, 77
karakteristikleri, 54-56
saptanması, 135-142, 154
Nükleoporinler, 372
Nükleosidler, kolaylaştırılmış difüzyonu, 544
Nükleotid kesip-çıkarma onarımı, 235-238, 238
Nükleotidler
nükleik asitler ve, 54
polimerizasyonu, 55
Nükleozom
kor partiküller, 206
kromatin organizasyonu, 205, 205
Nükleus (çekirdek), 367-395
Cajal cisimcikler, 392
lamina, 370
nükleer zarfı, 367-381
ökaryotik, 9
protein içeri alınması, 380-381, 393
protein taşıması, 373-378
Nüleer faktör-κB (NF-κB)
düzenlenmesi, 701
geribesleme inhibisyonu, 642, 642
sinyalleşme, 638, 638
taşınması, 380
transkripsiyon faktörleri, 638

O

O^6-Metilguanin metiltransferaz tamiri, 234, 234
O-bağlı Oligosakkaritler, 347
Oct4 transkripsiyon faktörü, 717

Okazaki fragmanları
başlangıcı, 220
birleşmesi, 221
sentezi, 220
tanımı, 219, 219-220
Okazaki, Reiji, 219
Okludinler, kuyrukları, 591
Oksidatif fosforilasyon, 89-95, 91, 107
Oksidatif metabolizma, 8
Oksijen (O_2), fotosentez ve, 8
Oksin yanıt faktörü (ARF), 611
Oksinler, 575, 610, 611
Oksitosin
aktivitesi, 607
fonksiyonu, 493
Olgunlaşmayı ilerleten faktör (MPF'ler), 657
keşfi, 658-659
regülasyonu, 662
siklinler ve, 661-662
tanımlanması, 657
yapısı, 660
Oligonükleotidler, 55
sentetik, 146
Oligosakkaridler
ER'de yapılanması, 346
hücre yüzeyi, 50
tanımı, 48
Omurgalılar
genomları, 160-164, 162, 163, 181
kullanan çalışmalar, 20-22
model organizma, 43
Omurgasızlar, örnek genomlar, 159
Onkogen bağımlılığı, 764
Onkogen üretimi, fonksiyonu, 766
Onkogenler, 625, 737-749
belirlenmesi, 741
hedeflenmiş terapiler, 761
homoloğu, 742
hücre sağkalımı ve, 749
ile etkilenen yolaklar, 758
insan tümörleri, 742
kanser ve, 766
retroviral, 737-738, 738
Oositler
G_2 evresi, 657
olgunlaşması, 657
Operatörler, operon transkripsiyonu ve, 264
Operonlar
fonksiyonu, 310
tanımı, 263-264
Orangutan genomu, 163
ORC'ler, 229
Organeller, kompozisyonu, 170
ori (replikasyon orijini), 131
Orijin tanıma kompleksleri (ORC'ler), 229, 668
Orta lamel, 594
Orthomyxoviruses, 42
Otofagozomlar, 441
Otofaji, 361
aktivasyonu, 359
düzenlenmesi, 634
fonksiyonu, 359, 359
lizozomlar ve, 440, 440-441, 443
rolleri, 702
tanımı, 441
Otofosforilasyon, 621
Otokrin çoğalma uyarımı, 729, 730
Otokrin sinyal, 602

Ö

Ökaryotik hücreler
DNA organizasyonu, 203
DNA polimeraz, 217-218
DNA tamiri, 234
evrimi, 43
gen fonksiyonu, 142-152
gen yapısı, 189
genleri, 187-194, 214
hücre döngüsü, 651-657
hücre duvarları, 573-577, 595
hücresel yapı, 9-11
mRNA işlenmesi, 297-299, 298
mRNA' lar, 324
nükleotid-çıkarımı tamiri, 237
orijini, 43
özellikleri, 4, 4
replikasyon orijini, 227, 227
represörler, 282-283, 283
ribozomlar, 321
RNA primerleri, 220
transkripsiyon faktörü izolasyonu, 279
transkripsiyonun regülasyonu, 271, 271-284, 311
translasyonun başlaması, 328
translasyonun düzenlenmesi, 335-336
uzama faktörleri, 330
Ökaryotlar, orjini, 11-13
Ökromatin, 207
dağılımı, 383
tanımı, 382
Ölümsüz hücre hatları, 38
Öncül diziler
amino uç, 453
mitokondrial proteinlerde, 454
Örümcek ipeği, 56
Östradiol, yapısı, 603
Östrojenler
emdometrium kanseri, 728
ile sinyal iletimi, 602
üretimi, 603

P

P maddesi, aktivitesi, 607
P1 yapay kromozom (PAC'lar), 132, 132
p120, 589
p15 Cdk inhibisyonu, 754
p16 Cdk inhibisyonu, 755
p16 proteinler, hücre döngüsü ilerlemesi ve, 755
p21
Cdk inhibisyonu, 699, 754, 755
hücre dongüsü inhibisyonu ve, 757
p27, 667, 754
p53
apoptozis tetikleme ve, 699, 699
düzenlenmesi, 701
etkisi, 755
hücre döngüsü duraksatması ve, 670, 755
p53 mutasyonları, 670
p53 tümör baskılayıcı gen, 752, 753
p57, Cdk inhibisyonu, 754
Pakiten, 681, 681
Palade, George, 30, 398
Palmitik asit, 349
Palmitoillenme, 349, 360
Paneth hücreleri, 709
Pankreas asinar hücreleri, 398, 428
Pankreatik kanser, 724
Pap smear, 734
Papanicolaou, George, 734
Papilloma virüsleri
kanser ile ilişkili, 734, 765
yapılı, 40
Papovavirüsleri, 38
Parakrin sinyal iletimi, 602
Paralel demetler, 485
Paramecium spp., 13
mikrografi, 14
silia, 514
Paramiksovirüsler, 42
Pasif transport, 76
Pasifik porsuk ağaçları, 503
Patched (PTCH) geni, 754
Patched protein inhibisyonu, 639
Pauling, Linus, 60, 117
PCNA, 222, 222
PDGFR onkogen, 742
Pektin

içeriği, 574
yapısı, 574
Pelger-Huet anomalisi, 371
Penisilin, 572
Pentoz şekerler, 49
Peptid bağları, 59, 59, 104
Peptid hormonları
aktivitesi, 607
büyüme faktörleri ve, 644
örnekleri, 607
Peptidil prolil izomeraz, 344, 344, 360
Peptidil transferaz reaksiyonu, 324
Peptidoglikanlar, *E. coli*, 572
Peraoksizom zar proteinleri, 473
Periferal zar proteinleri, 71, 536
PERK, aktivasyonu, 416
Perlekan, kollojene bağlanan, 582
Permeaz, kodlayan genler, 263
Peroksin, 470-471
Peroksizom biyogenez bozuklukları, 471, 472, 472
Peroksizom hedefleyen sinyal 2 (PTS2), 472
Peroksizom matriks proteinleri, 473
Peroksizomlar, 467-474
fotosolunum, 470
işlevi, 10, 468-470, 475
mikrografi, 467
oluşumu, 474
yapılanması, 470-474, 470, 476
Pex genleri, 472-473
Pex proteinleri, 470-471
pH (proton konsantrasyonu), fotosentez ve, 99
Pho4, 380-381
PI 3-kinaz, 630-631
aktivasyonu, 699
hücre sağ-kalımı ve, 700, 749
ile ERK kinazlar arasında çapraz iletişim, 643
ile sinyalleşme, 644
inhibitörleri, 764
onkogenik etkisi, 748
yolaklar, 630-635, 631
PI3K onkogen, 742, 757
Picornaviruses, 38
Pirimidin bazları
biyosentezi, 106
dimer tamiri, 234
nükleik asitler ve, 54
Pirimidin dimerleri, oluşumu, 234
Pirimidin ribonükleotidler, 106
Piruvat
oksitatif dekarboksilasyonu, 87
taşınması, 448
Plakin, 522
Plakofilin, 523
Plakoglobin, 523
Plasmodium spp.
P. falciparum, 179, 180, 180
P. knowlesi, 180
P. malariae, 180
P. ovale, 180
P. vivax, 180
Plastidler, 458-467, 475
birbirlerine dönüşümü, 466
tanımı, 465
Plastokinon, 98
Platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF), 703
aktiviteleri, 607
hücre proliferasyonu ve, 655
reseptörleri, 620, 745
yara iyileşmesi ve, 608
Platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF) reseptörü, 762-763
Platypus genomu, 162, 163
Plazma zarları, 531-570
akışkan mozaik model, 534-540, 535
apikal bölge, 541
bazolateral bölge, 541
bölgeleri, 428, 540-544, 567
depolarizasyon, 548-548
E.coli, 8
elektron gradienti, 547-548
fosfatidiletanolamin, 532
fosfatidilinozitol, 532
fosfatidilserin, 532
glikolipidler, 533
hayvan hücreleri, 70
integral proteinler, 536
kalsiyum kanalları, 636-637
kolesterol, 533
kortikal hücre iskeleti, 487
lipid çift tabaka, 531-534, 532
lipid kompozisyonu, 532, 533
memeli, 555
periferal protein, 536
protein çapalanması, 539
protein çözünürlüğü, 536
protein hareketliliği, 535, 567
protein katılması, 406
protein taşınması, 429
proteinler, 534-540
sfingomiyelin, 532
stres lif bağlanması, 488
transmembran proteinler, 536-537
yapısı, 531-544, 567
Plazmalojen, 468
Plazmid vektörleri, 128, 131
Plazmodezmata, 594-595
hücre-hücre etkileşimi, 596
yapısı, 594
Plektin köprüsü, 524
Plektin, integrin bağlantısı, 586
Pluripotent kök hücreler, 712-718, 720
uyarılmış, 717, 717-718
Pluripotentlik, tanımı, 712
Pluripotentlik, transkripsiyonel program, 717
PML/RARα onkogen, 742, 760
PML/RARα onkogen protein, 748, 748
Pneumococcus
DNA'sı, 115
hücre duvarı, 571
Pol geni, 736
Poli-A bağlanma proteini (PABP), 329, 334
Poli-A kuyrukları, 298, 312
Poliadenilasyon, 312
RNA'nın, 309
tanımı, 298-303
Polikomb baskılayıcı kompleks (PRC'ler), 290, 291, 294
Polikomb cisimler, 391, 391, 393
Polikomb proteinler, 290-291, 291, 312
Polimeraz yardımcı proteinler, 222
Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR)
DNA amplifikasyonunda, 135-137, 136
gerçek-zamanlı, 137
Polinükleotidler, 55, 106
Poliovirüs, 38
Polipeptid büyüme faktörleri
aktiviteleri, 607
prototipler, 637
Polipeptid zincirleri
BiP bağlama, 405
hidroksiprolinde, 579
prolinde, 579
sentezi, 537
taşınması, 402
yer değiştirmesi, 409
Polipeptid, katlanması, 58
Polipler, 726
Poliribozom. Bkz. Polizomlar
Polisakkaridler
bitki duvarı, 427
ekstraselüler matriks, 581-582
hücre duvarı, 573
hücre yüzeyi, 50

metabolizması, 426-427
salgı yolağı, taşınması, 427
sentezi, 102
tanımı, 48
yapısı, 50
Polisistronik mRNA'lar, 325
Poliübikütin zincirler, 357
Polizomlar, tanımı, 332
Polo-benzeri kinazlar, 674
ile fosforilasyon, 676
yıkımı, 678-679
Polyomavirüsler
dönüştürme, 734
kanser ilintili, 734
replikasyonu, 734
Porinler, 449
mitokondrial, 460
Porter, Keith, 30
Potasyum (K^+) iyon kanalları
akım doğrultusu, 457
iyon seçilimi, 551, 551-552
voltaj-kapılı, 548, 549, 550
yapısı, 552
Potasyum (K^+) iyonları, hücresel, 47-48
Poxvirüsleri, 38
Pozitif transkripsiyon-uzama faktörü-b (P-TEFb)
Pre-mRNA, 312
kesip-çıkartılması, 301
kısa ekzonlar, 305
modifikasyonu, 297
Prenillenme, 361
C-ucu sistein kalıntıları, 348
tanımı, 349
Pre-rRNA, 295-297, 312, 389
Pre-tRNA, 312
Primazlar, fonksiyonu, 220, 227
Prion proteinler, (PrPs), 343, 343, 360
Profaz, 517
mitoz, 670, 671, 672
Profilin, 482
Progesteron
üretimi, 603
yapısı, 603
Programlanmış hücre ölümü. Bkz. Apopitoz, 691-701
alternatif yolakları, 702, 719
apoptozis ve, 719
başarısızlık, 732, 748
C.elegans'da, 695
düzenlenmesi, 351
fosfatidilserin yer değiştirmesi, 533
gelişim ve, 692
katılan genler, 694
olaylar, 719
otofaji, 359
Proinsülin, 345-346, 345
Prokaryotik hücreler
70S ribozom, 321
DNA organizasyonu, 203
DNA polimerazlar, 218
evrimi, 43
karakteristikleri, 4, 4
mRNA'lar, 324
replikasyon orijini, 227
RNA primerler, 220
salınım faktörleri, 331-332
uzama faktörleri, 330
Prokollejen, 580
Prolaktin, aktiviteleri, 607
Prolil hidrolaz, 579
Prolin
yan zincir, 56
yapısı, 57
Prometafaz, 673
mitoz, 671, 672
Promotörler
ökaryot, 271
RNA polimeraz bağlanması ve, 260
Proplastidler, 465
Prostaglandin H_2, 609
Prostaglandinler, 609
Prostasiklin, 609
Prostat kanseri, insidansı, 724-725
Prostetik gruplar, 66
Protein disülfit izomeraz (PDI), 343-344, 343, 360
fonksiyonu, 412
kalneksin ile ilişkili, 415-416
kalretikulum ile ilişkili, 415-416
Protein fosfataz, 361
Protein fosfataz 1, 618
Protein glikozilasyonu (ER), 413
Protein işlenmesi
endoplazmik retikulum, 411-414
kesilme, 344-346
Protein katlanması
endoplazmik retikulum, 411-414, 412
ER, 441
hatalı-katlanma hastalığı, 341-343, 360
protein işlenmesi ve, 338-350
şaperonlar ve, 338-340, 360
termodinamik hipotezi, 58
Protein katlanmasının termodinamik hipotezi, 58
Protein kinaz A (PKA)
düzenlemesi, 616
fonksiyonu, 618
ile Ci/Gli fosforilasyonu, 639
Protein kinazlar, 352
fonksiyonu, 351-352
mitotik, 674
tanımlanması, 361
Protein kompleksleri, analizleri, 171
Protein sentezi, 317-363
de mRNA organizasyonu, 324-326
de mRNA translasyonu, 317-337
de ribozom, 319-324
translasyonun düzenlenmesi, 332-337
Protein tasnifi
için yolaklar, 427-429
taşınması ve, 397-445
Protein taşınması
Golgi'den, 427, 427-429
için salgı yolağı, 427
şaperonlar, 339
tasnif ve, 397-445
zarların diğer tarafına, 402
Proteinler
bir araya gelmesi, 341
biyosentez, 108
bölgeleri (domainleri), 61
denaturasyonu, 60
düzenlenmesi, 350-357, 361
ER'lerden dışarı çıkartılması, 420-421
etkileşimleri, 171-173, 181
etkileşme haritaları, 173
fosforillenme, 69, 69
Golgi'de glikozilasyon, 423-425
hatalı katlanmış, 414-415
hücre zarı, 77
hücresel, 77, 181
için prob olarak antikorlar, 140-142, 154
ikincil yapısı, 60, 61
ile genlerin doğrusal ilişkisi, 120, 120, 153
kesilmesi, 344-346
kuarterner yapısı, 62, 62
lipid-globüler mozaik model, 73
lokalizasyonu, 181
memrandan taşınma, 339
modifikasyonları, 355
özellikleri, 56-62
primer yapısı, 60
sentezi, 6
tanımlanması, 167-170, 169, 181

tespit edilmesi, 135-142
üçüncül yapısı, 61, 61
yeniden katlanması, 60
yıkılma, 357-359
zar, 71-74
Protein-protein etkileşimleri, 173
Proteoglikanlar
oluşumu, 581
yapısı, 425
Proteoliz, 360
lizozomal, 358-359
Proteomiks, 167-170, 167-173
Proteomlar, 167
Proteozomlar, 357, 361
Proton gradienti, 94
Proto-onkogenler, 739-741, 740, 766
Prusiner, Stanley, 343
P-Selektin ekspresyonu, 588
Psödopodlar, 490
Psödoüridin, 389
PTCH tümör baskılayıcı gen, 753
P-TEFb, 284
PTEN tümör baskılayıcı gen, 753
hücre proliferasyonu ve, 753, 753
hücre sağkalımı ve, 753
mutasyonları, 758
PUMA, fonksiyonu, 756
Pürin bazları
biyosentezi, 106
nükleik asitler ve, 54

R

Rab proteinler, 435
taşıma basamağı, 435
Rabl, Carl, 381
Rad51, 243, 243, 254
Radyasyon
çift iplik kırılması, 242
DNA hasarı, 233
raf onkogen, 741
Raf proteinleri, 741
aktivasyonu, 628
kodlayan genler, 746
serin/treonin kinaz, 627, 746
RAG mutasyonları, SCID ve, 250
Ran-GTPaz aktive edici protein (RanGAP), 356, 376, 375-377
Rapamisin, 634
ras genleri, 351
Ras onkogen proteinleri, 349-351, 351
ras onkogenleri, 625
kolon kanseri ve, 625
nokta mutasyonlarında, 743
Ras proteinleri
aktivasyonu, 628
düzenlenmesi, 627
fonksiyonu, 668
kanser ve, 625
mitojenik sinyal ve, 746
Rasgele optik yeniden yapılandırma mikroskobu (stochastic optical reconstruction microscopy: STORM), 33, 33-34
rasH onkogen, 742
ilişkili kanser, 742
rasK onkogen
ilişkili kanser, 742
kolon kanseri ve, 757
rasN onkogen
kanser ilişkili, 742
Rb genleri, 667
delesyonunda, 752
DNA tümör virüsleri ile etkileşim, 752
mutasyonları, 751
Rb proteinleri
hücre döngüsü ilerlemesi ve, 755
tanımlanması, 667
Rb tümör baskılayıcı genler, 750, 753
Rb/E2F kompleksi, 667
RecA, 243, 243, 254
Reese, Thomas S., 509, 509, 510
Rekombinant DNA, 126-135
için vektörler, 153
kütüphaneleri, 138-139, 139
oluşturulması, 128, 153
Rekombinasyonel tamir, 242-243
Replikasyon çatalı
DNA replikasyonu ve, 218-225, 219, 254
E. coli, 224
Replikasyon fabrikaları, 385, 385
Replikasyon faktörü C (RFC), 222, 222
Replikasyon orijini, 130, 226, 226-230
Represörler
fonksiyonu, 310
ökaryot, 282-283, 283
rolü, 264
Reprodüktif klonlama, 716-717
Reseptör etkileşimli protein kinaz-3 (RIPK3), 702, 702
Reseptör olmayan trozin kinazlar, 622-626, 645
Reseptör tirozin kinaz, 619-622, 620, 644-645
aşağı yönde sinyal, 621
dimerizasyonu, 621
otofosforilasyonu, 621
Reseptörler, ligand bağlı, 611-612
Restriksiyon endonükleazlar, 153
ile hedeflenen, 129
tanıma bölgesi, 126
Retinoblastoma
gelişimi, 751
kalıtımı, 750
Retinoidler, üretilmesi, 604
Retinoik asit
hücre farklılaşması ve, 748
kanser terapisinde kullanımı, 761
üretimi, 604
yapısı, 603
Retinoik asit reseptörleri (RAR'leri), 760
Retrogenler, yeri değişmiş, 202-203, 203
Retrotranspozisyon, 202
Retrotranspozonlar, hareketi, 199
Retrovirüs-benzeri elemanlar, 198
Retrovirüsler
de revers transkriptaz, 230
genom, 38, 737
kanser ve, 733, 736-737, 766
onkogenler, 738
replikasyon, 124, 124
tanımı, 44, 124
vektörler olarak, 143
Revers (ters) transkripsiyon
RNA virüsleri ve, 124-126, 153
Revers (ters) transkriptazlar
fonksiyonu, 126
telomeraz ve, 230
Rheb, inhibisyonu, 633
Rhesus macaque (makak) genomu, 162, 163
Rho proteinleri, 263, 491, 492
Rhodopsuedomonas viridis, 538, 538
rII genleri, 122
RISC (RNA-uyaran sessizleştirme kompleksi), 150
Ribonükleaz
katlanması, 58
renaturasyonu, 58
Ribonükleik asit. Bkz. RNA
Ribonükleo protein (RNP'ler), taşınımı, 379
Ribonüleotid trifosfatlar (NTP'ler), polimerizasyonu, 260
Riboz, 54-55
Ribozimler, 297, 312
Ribozomal RNA (rRNA)
26S, yapısı, 322
baz eşleşmesi, 320
dönüştürülmesi, 323

fonksiyonu, 54
genler, 388
ikincil yapısı, 322-323
işlenme, 295, 295-297
protein sentezi ve, 196
ribozomlarda, 319
transkripsiyonu, 265, 270
Ribozomlar
50S altbirim, 323
70S, 321
fonksiyonu, 9, 360
in vitro yapılanması, 323
mRNA translasyonu, 332
protein sentezi ve, 319-324, 400
translasyonun başlamasında, 329
yapılanması, 390
yapısı, 321
Ribüloz-1,5-bifosfat, 461, 469
Rickettsia prowazekii, 450
Riyanodin reseptörleri, 637, 637
RNA (Ribonükleik asid)
dönüşümü, 295-310
düzeltilmesi, 307-309, 312
işlenmesi, 295-310
kendi-kendine replikasyonu, 5
kodlamayan, 192, 196-197, 214
sentezi, 121, 220, 259-315
taşınımı, 378-380, 393
tipleri, 317
yıkılımı, 309-310
RNA dünyası, 5-6
RNA helikaz, 379
RNA interferens (RNAi), 154
aracılığı, 196
deneysel kullanımı, 334
etkisi, 151
genom boyu taramada kullanımı, 174
ile gen ekspresyon inhibisyonu, 150, 152
RNA kesip-ekleme, 189-190
RNA polimeraz başlangıç öncesi kompleksi, 266-267
RNA polimeraz I
fonksiyonu, 311
ile transkripsiyon, 269-271
RNA polimeraz II, 664
ile transkribe edilen genler, 265
ile transkripsiyon, 284
maya, 266
mediyatör kompleksler ile, 269
RNA polimeraz III
fonksiyonu, 311, 387
ile transkripsiyon, 265, 269-271
transkripsiyonu, 270
RNA polimerazlar
altbirimleri, 260, 266
bakterial, 262
ile genlerin transkripsiyonu, 265
inhibitörleri, 482
ökaryotik, 265-271, 310
tanımı, 121
transkripsyon ve, 260-263, 261, 310
RNA primerleri
sentezi, 220
uzaması, 220
RNA virüsleri, revers transkripsiyon ve, 124-126, 153
RNA-DNA hibridleri, 189
analizi, 191
RNA-seq, 167, 167
RNA-uyaran sessizleştirme kompleksi (RISC), 150, 334
RNaz
fonksiyonu, 323
RNaseP, 324
yeniden katlanması, 338
RNaz H, fonksiyonu, 220
RNaz P, 297, 312
Roberts, Richard, 189, 190, 190
Rodopsin, 619
Roeder, Robert, 266
Rothman, James, 430, 435
Rous sarkom virüsü (RSV), 736-737
DNA provirüs hipotezi ve, 125
genom, 738
genom boyutu, 353
ile hücre dönüştürme, 736-737, 737
izolasyonu, 41, 353
odak testi (focus assay), 733
Rous, Peyton, 41, 42
Rubella virüsü, 38
Rubin, Harry, 732
Rubisco (ribuloz bifosfat karboksilaz/oksijenaz), 461, 469, 470
Ruderman, Joan, 660, 661

S

S evresi
Cdk'lar süreci, 668-669
DNA replikasyonu ve, 668-669
ökaryotik hücreler, 652
S6 kinaz, 634
Sabatini, David, 401, 402
Saccharomyces cerevisiae, 629
cdc28 mutasyonları, 659
elektron mikrografı, 13, 18
eşleşme tipi değişimi, 245
eşleşme tipleri, 244-245
genomu, 158-159, 159, 204
hayat döngüsü, 244
hücre döngüsü düzenlenmesi, 653-654
intronlar, 192, 192
model organizma, 43
ORC'de, 229
sentromerik DNA dizileri, 211
tanımı, 13
Saccharomyces pombe
hücre döngüsü mutasyonları, 659
ORC'lerde, 229
sentromierik DNA dizileri, 211
Safra asitleri, 468
Sağırlık, 593
Salgı granülleri, protein paketlenen, 428
Salgı proteinleri hedeflenmesi, 403
Salgı vezikülleri, taşınması, 398
Salgı yolakları
düzenleyici sinyallerde
lipid taşınması, 427
maya çalışmaları, 435
polisakkarit taşınması, 427
protein taşınması, 427
salgılanan proteinler, 399
topolojisi, 407
Sanger, Frederick, 59, 132
Sanofi, 179
Santrifügasyon, 34-35
Sarı humma virüsü, 42
Sarkomalar, tanımı, 724
Sarkomerler
fonksiyonu, 493-494
yapısı, 495
Sarkoplazmik retikulum
den kalsiyum salınması, 497
riyanodin reseptör, 637
α-Sarmal, 60, 61, 72, 117, 281
Sarmal-dönüş-sarmal bölgeler, 311
DBA-bağlama bölgeleri, 281-282
kompozisyonu, 281
Sarmal-dönüş-sarmal motifleri, 311
fonksiyonu, 280-281
kompozisyonu, 281
Satallit DNA, 198, 198
Satallit hücreler, çekirdek, 710
Scaffold (yapı iskelesi) proteinleri, 630, 630
SCF^{TIR1}, 611, 611
Schatz,Gottfried, 453
Schekman, Randy, 435
Schleiden, Matthias, 23
Schwann, Theodor, 23
Scrapie, 343

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi, 141
Sec yolağı, 463
Sec62.63 kompleksi, 404
Sefton, Bartholomew, 353, 353, 354
γ-Sekretaz
Notch kesimi, 641, 641
Sela, Michael, 58
Selektinler
E-selektin ekspresyonu, 588
hücre-hücre etkileşimleri ve, 587, 588
P-selektin ekspresyonu, 588
Selenosistein, 319
Selüloz
bitki hücre duvarları, 573, 574
fonksiyonu, 49
sentezi, 576, 577
Selüloz sentaz, 576
Sentetik biyoloji, tanımı, 178-180
Sentriol çevre maddesi, 506
Sentriyoller, 10, 506, 517
Sentromerler
DNA dizileri, 207, 211
fonksiyonu, 208-213, 214
kinetekor mikrotübül tutunması, 518
kondensinlerde, 674
kromatidlerde, 672, 675
maya, 210, 210
metafaz, 209
tanımı, 214
Sentrozomlar
duplikasyonu, 517, 517, 672, 676
elemanları, 516-517
fosforilasyonu, 674
iğ oluşumu ve, 518
mikrotübüller, 502, 507, 507
mitoz sırasında, 671
mükrotübüllerden, 505, 505, 518, 675, 676
protein kompozisyonu, 170
tübülinlerde, 501
Seramid, sentezi, 419
Serbest bırakma faktörleri, 331
Serin proteazlar, 65
Serin, yapısı, 57
Serin/trionin kinazlar, 352, 352, 361, 637
Serotonin, yapısı, 606
Serum yanıt elemanları (SRE'ler), 628-629
Serviks kanseri
den HeLa hücrelerinin eldesi, 38
ilişkili virüsler, 733
korunma, 734
Sezyum klorid (CsCl) gradianları, 118
Sfingolipid
sentezi, 457
taşınması, 457
Sfingomiyelin
lipid sal, 542
plazma zarı, 70, 532
sentezi, 426, 426
yapısı, 52
SH2 (*Scr* homoloji) domeinleri, 621, 622, 635
Sharp, Phillip, 189, 190, 279
Sheetz, Michael P., 509, 509, 510
Shine, John, 325
Shine-Dalgarno dizileri, 325, 325
Sıçan genomu, 162, 163
Sıkı bağlantılar, 590-591, 592, 595
Sınıf değiştirme rekombinasyonu, 251, 251, 252
Sıtma
engellenmesi, 180
için tedavi, 179, 180
sentetik biyoloji, 180
tanımı, 180
temelinde, 180
Siklik AMP (cAMP)
ile uyarılan gen ekspresyonu, 617
sentezi, 612, 615
üretimi, 354
yıkılması, 615
yolakları, 615-618
Siklik GMP (cGMP), 606, 618-619, 644
Siklin A, 660-665, 670
Siklin B, 357, 358
Siklin bağımlı kinazlar (Cdk's)
aileleri, 663-665
siklinler ve, 663
Siklin D, 665, 665, 667, 746
Siklin E hedefleri, 757
Siklinler
aileleri, 663-665
birikimi, 660
fonksiyonu, 357
siklin bağımlı kinazlar ve, 663
tanımlanması, 661-662
tipleri, 660, 662
yıkılması, 358, 660
Siklooksijenazlar (COX'lar), 609-610
Sil
aksonem yapısı, 515
bazal cisimler, 506, 516
dineinde, 509, 511
hareketleri, 508, 516
kamçı ve, 514-517
mikrografiler, 514
olfaktör nöronlar, 613
Paramezyum, 13
Simian virüs 40 (SV40)
çalışmaları, 222, 272, 279
güçlendirici, 272
kanser ile ilişkili, 733, 734
Rb bağlama, 752-753
replikasyon orijini, 227
replikasyonu, 222, 227
T antijen, 373, 374, 374, 375
Simport, 559
Sinapslar, -den nörotransmitter salınımı, 550
Sinaptik veziküller, fonksiyonu, 431
Singer, Jonathan, 73, 536
Sinir büyüme faktörü (NGF), 699
aktiviteleri, 607
keşfi, 607
reseptörleri, 620
Sinir hücreleri. Bkz. Nöronlar
aksiyon potansiyeli, 548-550
mikrotübül organizasyonu, 507
Sinyal ağları, 176, 182, 642-643
Sinyal dizileri, 344, 360
büyüme hormonu, 403
ER hedefleme ve, 400
kesilebilir, 409
zar translokasyonu ve, 345
Sinyal hipotezi, 402
Sinyal iletimi, kanser, 625
Sinyal molekül reseptörleri, 601-611
Sinyal molekülleri, 601-611
Sinyal peptidazlar, 344, 360, 404
Sinyal tanıyan partikül reseptörleri, 403-404
Sinyal tanıyan partiküller (SRP'ler), 403
RNA (SRP RNA), 403
Sec62 yolağı, 406
Sinyal yamaları, 424
Sistein, yapısı, 57
Sistem biyolojisi, 173-174, 174, 182
Sistemik lupus eritromatoz (SLE) antikorları, 303
Sisterna modelleri, 423
Sisterna olgunlaşma modeli, 423
Siteroidler, nükleer reseptörler için, 644
Sitokalasinler, 482, 491
Sitokin reseptörü aktivasyonu, 623
Sitokin reseptörü süperailesi, 622-626
Sitokinez
bitki hücresi, 679

mitoz, 671
mitoz sırasında, 673
mitozun tamamlanması ve, 678-679
ökaryot hücrelerde, 652
tanımlanması, 498, 499
Sitokininler, 610
Sitokinler, 608
Sitokrom *bf* kompleksi, 97, 99
Sitokrom *c*, 91, 698
Sitokrom oksidaz, 91
Sitoplazmik dinein, 511
Sitozin, 54
Sitrik asit döngüsü, 87, 88
Siyanobakteriler, 8
Sklerenkima hücreleri, 15
Skoot, Rebecca, 39
Smad ailesi fosforilasyonu, 638
Smad yolağı, TGF-β ve, 645
Smad2 tümör baskılayıcı gen, 753, 754
Smad4 tümör baskılayıcı gen, 753, 754
Somatik hücreler, transdiferansiasyon, 718, 720
Smith, Alan, 374, 374
Smith, Dennis, 657, 658
SNARE proteinleri, 435, 435-436
Sodyum (Na^+) iyon kanalları
akım doğrultusu, 457
iyon seçilimi, 551, 551
voltaj-kapılı, 550
yapısı, 552
Sodyum (Na^+) iyonları
gradienti, 558
hücresel, 47-48
Soğan genomu, 204
Somatik hipermutasyon, 252, 252
Somatik hücre çekirdek nakli, 715-717, 720
Sorafenib, 760
Southern blotlama, 137-138, 138
Southern, E. M., 137
Sox2, transkripsiyon faktörü, 717
Soyun/potasyum (Na^+-K^+) ATPaz, 553
Sodyum/potasyum (Na^+-K^+) pompası, 553
fonksiyonu, 553
operasyonu, 554
yapısı, 553
Sp1, transkripsiyon faktörü, 278, 279
Spektrin, 486, 487
Splisozom, 312
tanımı, 301
yapılanması, 302, 305
Src ailesi proteinleri, 624
src onkogenler, 738
keşfi, 740
Src protein, 353
Stahl, Frank, 118
Staphylococcus hücre duvarı, 571
START düzenleyici proteinler, 654, 663
STAT proteinleri, 623, 623-624
Statinler, 563
Steitz, Joan, 303-304
Steitz, Thomas, 323
Steroid hormon reseptörleri, 311
fonksiyonu, 280
siteroidler ve, 644
Steroid hormonları
aktivitesi, 603-605
kolesterol ve, 54
yapısı, 52, 603
Steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID'ler), 609
Sterosil, 490
STORM (Rasgele optik yeniden yapılandırma mikroskobu: stochastic optical reconstruction microscopy), 33, 33-34
Stres lifleri, 488
fokal adhezyon ve, 488
kasılabilen yapılanma ve, 498
tutunması, 488
Stroma işlemci peptidazlar (SPP'ler, 463
Stroma, kloroplast, 460
Su (H_2O)
fotosentetik reaksiyonları ve, 8
taşınması, 546
Su dengesi, 546
Su kanal proteinleri. Bkz. Akuaporinler
Substratlar
enzim, 63, 64
serin proteazlar tarafından bağlanma, 65
Sudhof, Thomas, 431
SUMO (küçük übikütin-ilişkili değiştirici), 355-356, 361
SUN proteinleri, 370
Sunitinib, 760
Sutherland, Earl, 615
Sülfür, atmosferik, 4
Sürekli iplik, 219, 219-220, 224
SV40 (Simian virüs 40), 373
SV40 promotör, 272
SV40 T antijeni, 373, 374, 374

Ş

14-3-3 şaperon, 700
Şaperonlar
ardışık etkileri, 340
HSP70 ailesi, 340
mitokondrideki, 339
protein katlanması, 338-340, 360
protein taşınması ve, 339
translasyon sırasındaki görevleri, 339
Şeçicilik faktörü 1 (SL1), 270
Şekerler
kolaylaştırılmış difüzyonu, 544
yapısı, 49
Şempanze, genomu, 162, 163
Şişe mantarı, genomu, 204
Şişe mantarı, yapısı, 23

T

T antijeni, 227, 374
T hücre reseptörleri (TCR'ler)
immünglobülün reaksiyonu ile, 247
yapısı, 249
T lenfositler, antijen reseptörler, 624
Takahashi, Kazutoshi, 717
Taksol, 502, 503
Talin, 488, 584, 586
Taramalı elektron mikroskobu, 32
Taşıma vezikülleri
deneysel yaklaşımlar, 430-431
füzyonu, 432, 435-436
GFP-işaretli, 431
kargo seçimi, 431-435
kenetlenmesi, 435
kılıf proteinleri, 431-435
mekanizması, 430-436
oluşumu, 432
Rap proteinleri, 435
vezikül füzyonunda, 435-436
vezükül tomurcuklanması, 431-435
Taşıyıcı proteinler, 75, 75, 544-546
Taşıyıcı RNA'lar (tRNA'lar), 317-319
aminoasit bağlanma, 319
fonksiyonu, 122, 360
işlenmesi, 295-297, 296
kodlanması, 451
protein sentezinde, 104-105, 196
tanımı, 121
transkripsiyonu, 265
yapısı, 318, 318
TATA kutuları, fonksiyonları, 268
TATA-bağlayan proteinler (TBP'ler), 268
Tatum, Edward, 115
Tau proteinleri, 507
aksonal, 508
Tavuk, genomu, 162, 163, 204

tax geni, 736
TBP-bağlanan faktörler (TAF'lar), 268
Tek iplik DNA bağlama proteinleri
eylemi, 223
replikasyon orijinleri ve, 227
Tekrarlayan diziler
arasında rekombinasyon, 200
DNA, 214
Tel/PDGFR onkogen, 746
Telofaz mitozu, 670, 671, 672
Telomerazlar
DNA replikasyonu ve, 230-232
eylemleri, 231
fonksiyonu, 213
Telomerik DNA, 213
Telomerler
DNA replikasyonu ve, 230-232
içeriği, 230
kromozom yapısı, 381
tanımı, 213, 214
yapısı, 213
yaşlanması, 230
Temin, Howard M., 125, 125, 732
Terapötik klonlama, 716, 716
Termoasidofiller, 8
Testesteron
üretimi, 603
yapısı, 603
TET ailesi enzimleri, 292
Tetrahymena sp.
28S rRNA, 302
den telomeraz RNA, 230
den telomerazlar, 213
histon asetiltransferaz, 286
kendi kendine kesip-çıkarma, 304
rRNA ribozom, 324
TFIIB tanıma elemanları (BRE), 268
TFIID, 268
TFIIH 664
The Immortal Life of Henrietta Lacks (Skloot), 39
Thermus aquaticus, 135-136, 136
T-hücre lösemisi, erişkin, 733
Tic kompleksi, kloroplast, 461
Tilakid zarı, 98
protein hedefleme, 464
tanımı, 459-461
Tilakoid lümeni, protein içeri girişi, 463
Till, James, 705
Tim kompleksleri, 453, 454, 453-456
Tim22, 455
Tim9-Tim10 şaperonlar, 455
Timin dimerleri, 236, 238
Timin nükleik asitler ve, 54
6-Tioguanin, 105, 105
Tiroid hormon reseptörleri, 605, 605
Tiroid hormonu
hücre farklılaşması ve, 748
üretimi, 604
yapısı, 603
Tirozin kinaz, 361
fonksiyonu, 619
fosfolipaz C aktivasyonu, 635
keşfi, 353
reseptör olmayan, 622-626
Tjian, Robert, 276, 279, 279
Toc kompleksi, kloroplast, 461
Togaviruses, 38
Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler), 638
Tom kompleksleri, 453, 453
Tomurcuklanan mayalar. Bkz. *Saccharomyces cerevisiae*
Tonegawa, Susumu, 246, 246, 247, 248
Topoizomerazlar
eylemi, 223-224
fonksiyonu, 223
tip II, 223
Topolojik olarak ilişkili bölgeler (TAD'lar), 274, 290-292, 311, 384
Trametinib, 761
Tranfeksiyon, tanımı, 142
Transasetilaz, kodlayan genler, 263
Transdüsin, 619
Transformasyon R to S bacteria, 115
Transforme edici büyüme faktörü-β, 711
Transforme edici büyüme faktörü-β, 637-638, 645
Transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β) reseptörleri
den haberleşme, 637
tipleri, 637-638
Transgenik fareler
kullanımı, 144
üretimi, 144, 145
Trans-Golgi ağı, 422
protein ayrımında, 427
protein taşınması ve 428
vezikül tomucuklanması, 427
Transit peptidler, kloroplast, 462
Transkripsiyon
bakteriyel, 259-265
düzenleyici elamanlarda, 193
düzenleyici proteinler, 276-279, 311
E. coli RNA polimeraz ile, 261
kontrolü, 263-264
microRNA, 196
ökaryotlarda düzenlemesi, 271, 271-284
RNA polimarazlar ve, 260-263
sonlanması, 262
tanımı, 6, 121
Transkripsiyon aktivatörleri, 282
Transkripsiyon fabrikası, 386, 386
Transkripsiyon faktörleri
bağlanma bölgesi, 274-276, 276, 311
belirlenmesi, 266
düzenlenmesi, 350
fonksiyonu, 311
kor (core), 717
nükleer taşınması, 380, 381
ökaryotlarda izolasyonu, 279
reseptör-eşlikli, 637-641, 645
RNA polimerazlar ve, 265-266
Transkripsiyon, düzenlenmesi, 546
Transkripsiyonel aktivatörler, 280, 280-282, 311
Transkripsiyon-eşlikli tamir, 238
Transkriptomlar
genomlar ve, 157-167, 181
tanımı, 166
Translasyon
başlaması, 324-326, 325, 328, 329, 360
düzenlenmesi, 332-337, 336, 360
genel değerlendirme, 326
işlenmesi, 326-332, 360
sonlanması, 331
şaperonlar, 339
tanımı, 6, 121
uzama evresi, 330
Translasyon faktörler, rolleri, 327
Translezyon DNA sentezi, 240, 254
Translokonlar
açılması, 408
tanımı, 404
yapısı, 404
Transmembran proteinler, 71-72
oryantasyonu, 409
plazma zarı, 536-537
yerleşimi, 409, 410
Transmisyon elektron mikroskopisi, 30
negatif boyama, 30
pozitif boyama, 30
Treonin deaminaz, 68
Treonin yapısı, 57
Treponema pallidum hücre duvarı, 571
Trichothiodystrophy, 237
Trigliseridler, 51
Trioz şekerler, 49

Triptofan
sentezi, 120
yan zincirler, 56
yapısı, 57
Tromboksanlar, 609
Tropomiyozin, 482-483, 488
aktin bağlayan, 497
aktin ile ilişkili, 497
Troponinler
aktin bağlayan, 497
TnC, 497
TnI, 497
Trozin, yapısı, 57
Trypanosomes, mitokondri mRNA'sı, 307-309
Turgor basıncı, 575
Tübülinler
mikrotübüller ve, 501
tipleri, 501-502
Tümor nekrozis faktörü (TNF) reseptörleri, 701
Tümör baskılayıcı genler, 666, 749-758, 766
etkilenen yolaklar, 758
örnekler, 753
tanımlanması, 750-753, 766
ürünleri, 753-757, 766
Tümör başlangıcı, 726
Tümör ilerlemesi, 726
Tümör nekroz faktörü (TNF)
den NF- κB sinyalleşmesi, 638
fonksiyonu, 638, 701
Tümör promotörleri, 727
Tümör virüsleri, 733, 733-737
Tümörler
anjiogenez ve, 730-731
benign, 723-724
büyüme faktörü salgısı, 760
gelişim evresi, 726
klonalitesi, 725, 725
tanımı, 723
Tümörleşme, baskılanmasının, 750
Tütün dumanı, karsinogenezde, 727
Tütün mozaik virüsü, 41, 124
Twin-arginin yer değiştirme (Tat) yolağı, 463
TβRII tümör baskılayıcı gen, 753, 754

U

Ubikinon (koenzim Q), 90, 92
Ubikütin, 355-356, 356, 361
Ubikütin ligaz, 611
kodlayan gen, 757
Ubikütin-proteozom yolağı, 357, 358, 357-358, 414
Ultrasantrifüjler tanımı, 34
Ultraviole (UV) ışık DNA hasarı, 233
Uniport, 559
Urasil
DNA'da, 235
kesip çıkartma (eksizyonu), 235
nükleik asitler ve, 54
UV ışığı, Bkz. Ultraviole (UV) ışığı
UvrA, 236
UvrABC eksinükleaz, 237, 238
UvrB, 236
UvrC, 236
Uzama faktörleri (EF'leri), 330, 330-331
Uzama, düzenlenmesi, 283-284, 285
Uzun dağınık elemanlar (LINE'ler), 198, 200

Ü

Üçlü kodlar
kanıt için, 122
UUU, 123
Üridin trifosfat, 69

V

V(D)J rekombinasyonları, 250, 251-252
Vaccinia virüs, 38
Vakuoller
bitki hücresi, 10, 429
maya, 429, 429
Vale, Ronald, 509, 509, 510
Valin
hidrokarbon yan zinciri, 56
yapısı, 57
Varmus, Harold, 739, 740, 740
Vazopresin, aktivasyonu, 607
Vektörler
ekspresyon, 134
klonlama, 130, 130, 132
kosmid, 131-132, 132
plasmid, 128, 131
rekombinant DNA, 153
retrovirüsler olarak, 143
virüsler olarak, 142-143
Vemurafenib, 761
Venter, Craig, 157, 161, 161, X, 179
Vezikül. Bkz. taşıma vezikülleri
COPII-kaplı, 433, 433-434
COPI-kaplı, 433, 433-434
kleatrin kaplı, 433, 433, 434, 440, 562, 562
salgılayan, 398
sinaptik, 431
Veziküller taşınma
deneysel yaklaşımlar, 430-431, 442
kargo seçimi, 431-435, 442
kılıf proteinler, 431-435, 442
mekanizması, 430-436
vezikül füzyonunda, 435-436
vezükül tomucuklanması, 431-435, 442
Video ile güçlendirilmiş diferansiyel interferans-kontrast mikroskopisi, 26
Video ile güçlendirilmiş mikroskopi, 510
Villin, 490
Vimentin, 521
Vinblastin, 502
Vinkristin, 502
Vinkülin, 488, 584
alımı, 586
Virüsler
hayvan, 42
kanser ve, 41
modellerin kullanımı, 44
nükleer replikasyonu, 373
replikasyon orijini, 227
replikasyonu, 116
vektör olarak, 143
yapı, 40-41
Vismodegrib, 761
Vitamin C, 579
Vitamin D
üretimi, 604
yapısı, 603
Vitaminler, koenzimler ve, 68
Vogt, Peter, 738
Vohwinkel sendromu, 593
Voltaj-kapılı kanal, 547, 552
kalsiyum (Ca^{2+}) iyonu, 550
potasyum (K^+) iyonu, 548, 549, 550
Volvox, 14

W

Wallace, Douglas, 452
Walsh Donal, 615
Warren, Robin, 728
WASP ailesi proteinleri, 492, 492
Watson, James, 116-117, 218
Weinberg, Robert, 741
Weintraub, Harold, 718
Western blotlama, 141
White, Fredrick Jr., 59
Wilkins, Maurice, 117
Wilkins, Maurice, 715
Wilmut Ian, 715
Wnt yolağı, 489, 638-641, 640, 645,

711, 747
Wobble, 319, 451

X
X kromozomu inaktivasyonu, 197, 197
XBP1, 416
X'e bağlı Emery-Dreifuss kas distrofisi, 371
Xenopus laevis
araştırmada kullanımı, 21
genomu, 204
laminası, 369
model organizma, 43
mRNA lokalizasyonu, 334
oosit mRNA'sı, 512
yumurtaları, 21
Xeroderma pigmentosum (XP), 237-238, 756
X-ışını kristallografisi, 60
Xist RNA, 197
Xist, lncRNA, 294
XPA'dan XPG'ye genleri, 237
Xylem fonksiyonu, 15

Y
Yağ asitleri
bağları, 50-51
biyosentezi, 103
modifikasyonları, 348, 349
oksidasyonu, 89, 448, 468
yapısı, 50
Yağ bezleri, 709
Yağlar. Bkz. Trigliseroller
Yalancı genler (Pseudogenes), 201-203
gen duplikasyonu ve, 214
işlenmiş, 202
kodlaması, 192
tanımı, 202
Yalıtıcı, fonksiyonu, 274, 311
Yamanaka, Shinya, 717
Yanlış eşleşme onarımı, 238-240
E. coli'de, 239
memeli hücresi, 239
Yanofsky, Charles, 120
Yapıştırıcı proteinleri, 56
Yara iyileşmesi, 490
Yara iyileşmesi
Yarı korunumlu replikasyon, DNA, 118, 118, 119
"Ye beni" sinyalleri, 692
Yeni nesil dizileme, 134, 164, 164-166, 165, 181
Yer değiştirebilen elemanlar
DNA transpozon, 198
gen duplikasyonu, 201-203
LINES, 198, 200
retrotranspozon, 199, 199
retrovirüs-benzeri elamanlar, 198
SINES, 198, 199, 200
yalancı gen, 201-203
Yeşil alg, *Volvox*, 14
Yeşil floresan protein (GFP)
denizanasından, 27
ile işaretlenen salgı proteinleri, 431
mikroskopide kullanımı, 27
Yılan zehiri, 636
Yıldızsı mikrotübüller, 518
Yoğun ipliksi bileşen (DFCs), 388
Yoğunluğa bağlı inhibisyon, 728
Yoğunluk-gradient santirfügasyonu, 36, 36
Youyou, Tu, 180
Yukarı-bölge bağlanma faktörleri (UBF'leri), 270
Yüksek çozünürlüklü ışık mikroskobu, 32-34, 44
Yüksek-enerjili bağlar, serbest enerji ve, 83
Yüksek-yoğunlukta lipoprotein (HDL), 563

Z
Z diskleri, 494, 494
Zambak genomu, 204
Zamecnik, Paul, 318
Zara tutunmuş büyüme faktörleri, 608
Zarlar
fosfolipid hereketi, 71
protein oryantasyonu, 406
proteinler, 71-74
sıvı mozaik modeli, 72
Zeatin, 610
Zebrabalığı
genomları, 162, 163, 163
model organizma, 43
yumurtaları, 22
Zellweger spektrum bozukluğu, 472
Zigoten, 681, 681
Zigotlar, 557, 685, 686
Zonula okludens ailesi, 591

Kitap Hakkında
Editör: Andrew D. Sinauer
Proje Editörü: Chelsea D. Holabird
Kopya Editörü: Kathie Gow
Ürün Müdürü: Christopher Small
Resim Araştırmaları: David Mclntyre
Kitap Tasarımı ve Yapımı: Jen Basil-Whittaker
Görüntüleme Programı: Dragonfly Media Group
İndeksi Hazırlayan: Sharon Hughes
Kapak ve Kitap Üretimi: R. R. Donnelley
Türkçe Çeviri: Neşe ATABEY – Ersan KALAY
Türkçe Çeviri Basımevi: İzmir Tıp Kitabevi Ltd. Şti.